

**Die Rolle von PIAS (Protein Inhibitors of  
Activated STATs) in der Regulation von STAT  
(Signal Transducer and Activator of  
Transcription) – vermittelten Funktionen  
trophoblastärer Zellen**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor medicinae ( Dr. med. )**

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von  
Levon Khachaturyan

geboren am 29.11.1980 in Eriwan, Armenien

2011

Gutachter:

1. Herr Prof. Dr. U. Markert, Jena
2. Frau PD Dr. C. Hipler, Jena
3. Frau Prof. Dr. U. Kämmerer, Würzburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.12.2011

## **Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen**

AIRE - autoimmune regulator

AS – Aminosäure

ATP – Adenosintriphosphat

CBP - cyclic-AMP-responsive-element-binding protein (CREB)-binding protein

CIS - Cytokine inducible SH2-containing protein

CTB – Zytotrophoblast

DAPI - 4,6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid

DHT – Dihydrotestosteron

DNA – Deoxyribonucleic acid

EGF - epidermal growth factor

enCTB - endovaskuläre CTB

evCTB - extravillöse CTB

EZM - extrazellulären Matrix

FACS - Fluorescence Activated Cell Sorting

FKS - fetales Kälberserum

FSGS - fokale segmentale Glomerulosklerose

FSH - follikelstimulierende Hormon

GM-CSF - granulocyte macrophage-colony stimulating factor

GnRH – gonadotropin releasing hormone

hCG - humanes Choriongonadotropin

HCV - hepatitis C virus

HGF – Hepatocyte Growth Factor

IFN-  $\gamma$  – Interferon- $\gamma$

IGF-2 - insulin-like growth factor-2

inCTB - interstitielle CTB

IL – Interleukin

JAK - Janus-Kinase

kDa - kiloDalton

LH - luteinisierende Hormon

LIF - leukemia inhibitory factor

Lys – Lysin

MAR – Matrix Attachment Regions

MITF - microphthalmia transcription factor

MMP – Matrixmetalloproteinasen  
mRNA – messenger RNA  
MS - Multipler Slerose  
NK-Zellen - Natürlicher Killerzellen  
NSCLC - non-small cell lung cancer  
P/S - Penicillin/Streptomycin  
PIAS - protein inhibitors of activated STATs  
PML - promyelocytic leukaemia  
pSTAT – phosphoryliertes STAT  
PTP - protein-tyrosine phosphatase  
RISC - RNA-induced silencing complex  
RNA - Ribonucleic acid  
RNAi - RNA-Interferenz  
RLD - RING Finger-like Domäne  
SAP - scaffold-attachment factor  
SAR - Scaffold Attachment Regions  
SH2 - Src-Homology-2  
shRNA - short hairpin RNA  
SHP - SH2-containing phosphatases  
siRNA - small interfering RNA  
SOCS - suppressors of cytokine signalling  
SSW – Schwangerschaftswoche  
STAT - Signal Transducer and Activator of Transcription  
STB – Synzytiotrophoblast  
SUMO - small ubiquitin-related modifier  
SV - simian Virus  
SCR - „scrambled“  
SDS-PAGE - SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese  
TAG - large T -Antikörper  
TGF- $\beta$  - transforming growth factor- $\beta$   
Tyr – Tyrosin  
vCTB - villöse CTB  
VEGF - Vascular endothelial growth factor



## Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....	I
Inhaltsverzeichnis .....	III
1. Zusammenfassung .....	1
2. Einleitung .....	3
2.1 Schwangerschaft – die Entstehung eines neuen Lebens.....	3
2.2 Von der Ovulation bis zur Implantation.....	3
2.2.1. Die Ovulation, die Konzeption und die Entwicklung der Blastozyste.....	3
2.2.2 Vorbereitung des Uterus auf die Implantation.....	6
2.2.3 Implantation .....	7
2.3 Plazentation und Invasion .....	8
2.3.1 Trophoblastendifferenzierung .....	8
2.3.2 Die Invasion der Trophoblasten und deren Regulation.....	9
2.4 Dysregulationen und Störungen.....	12
2.4.1 Sterilität und Infertilität .....	12
2.4.2 Fehlgeburt.....	12
2.4.3 Präeklampsie .....	13
2.4.4 Trophoblastentumoren.....	14
2.5 Zytokine und Wachstumsfaktore in der Schwangerschaft.....	15
2.5.1 Leukemia Inhibitory Factor (LIF).....	16
2.5.2 Interleukin-6 (IL-6).....	17
2.5.3 Interleukin-11 (IL-11).....	18
2.5.4 Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) .....	19
2.5.5 Hepatocyte Growth Factor (HGF) .....	20
2.5.6 Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) .....	20
2.6 Signalkaskaden – intrazelluläre Signalübertragung.....	21
2.6.1 JAK/STAT-Signaltransduktionsweg .....	22
2.6.2 Die Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) -Familie.....	23
2.6.3 Negativregulation des JAK/STAT-Signalwegs .....	24
2.6.3.1. SHP-Familie .....	26
2.6.3.2. Feedback-Hemmung durch SOCS –Familie .....	27
2.6.3.3. Negativregulation durch PIAS-Familie.....	28

3. Ziele der Arbeit.....	35
4. Material und Methoden .....	37
4.1 Biologische Materialien.....	38
4.1.1 Zelllinien.....	38
4.1.2 Die Isolierung der primären Trophoblastzellen .....	41
4.1.3 Isolierung von Lymphozyten .....	42
4.2 Methoden .....	42
4.2.1 Bestimmung der Lebend-Zellzahl mit Trypan-Blau .....	42
4.2.2 RNA-Interferenz.....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
4.2.3 Proteinnachweis.....	47
4.2.4 Funktionelle Tests.....	50
4.2.5 Durchflusszytometrie .....	52
4.2.6 Immunzyto- und Immunhistochemie .....	54
4.2.7 Statistische Auswertung.....	56
4.3 Geräte und Reagenzien .....	57
4.3.1 Geräte.....	57
4.3.2 Verbrauchsmittel .....	58
4.3.3 Reagenzien.....	58
4.3.4 Zellkulturmedien.....	60
4.3.5 Antikörper .....	60
4.3.6 Transfektionsreagenzien.....	61
4.3.7 Herstellung benötigter Reagenzien.....	62
5. Ergebnisse .....	68
5.1 Expression der PIAS-Isoformen, STAT1 und STAT3 in verschiedenen Zelllinien .....	68
5.2 Expression von PIAS in primären isolierten I. und III. Trimester Trophoblastzellen .....	70
5.4 Induktion der PIAS-Expression durch Cytokine in JAR und JEG-3 Zellen.....	70
5.5 Etablierung des PIAS-„Knockdowns“ in JAR Zellen mittels SDS-PAGE und Western-blot nach 48 und 72h .....	72
5.6 Nachweis des PIAS-„Knockdowns“ in JAR Zellen nach 48 mittels SDS-PAGE und Western-blot .....	74
5.7 Der Einfluß des PIAS-„Knockdowns“ auf die Phosphorylierung von STAT3 ...	76

5.8 Funktionelle Tests .....	78
5.8.1 Der Einfluß des PIAS-„Knockdowns“ auf die Proliferation von JAR-Zellen	78
5.8.2. Der Einfluß des PIAS-„Knockdowns“ auf die Invasion von JAR-Zellen....	79
5.9 JAR VS. JEG-3, funktionelle Tests .....	80
5.10. Proliferations-, Migrations- und Invasionsassay mit 6 Zelllinien .....	81
5.11 Immunhistochemischer Nachweis der Lokalisation von PIAS in der Plazenta .....	82
5.12 Immunzytochemischer Nachweis der Lokalisation von PIAS in JAR-Zellen..	83
5.13 Vergleichsanalyse der Lokalisation von pSTAT3-Signal in in verschiedenen Zelllinien .....	84
5.15 Immunzytologische Analyse von pSTAT3-Signal in JAR- Zellen nach PIAS- „Knockdown“ .....	85
6. Diskussion.....	87
Abbildungsverzeichnis .....	VI
Literaturverzeichnis.....	VII

## **1. Zusammenfassung**

### ***Einleitung***

Die Invasion der menschlichen fetalen Trophoblastzellen in das Gebärmuttergewebe während der Plazentation ist im Normalfall ein sehr exaktkontrollierter Prozess. Eine Reihe von Zytokinen und von ihnen aktivierten intrazellulären Signalmolekülen beteiligen sich an der Regulation der Invasion. Fehlregulationen können zu schwangerschaftsassozierten Pathologien wie Präeklampsie, Molenbildung, IUGR oder Chorionkarzinom führen.

Andererseits kann die Plazenta als ein physiologisches Tumormodell angesehen werden. Aus dieser Sicht ist ein besseres Verstehen der Regulationsmechanismen in Trophoblastzellen für das Verständnis der Entstehung und Ausbreitung von Tumoren von großer Bedeutung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle von PIAS (protein inhibitors of activated STATs) in der Negativ- Regulation verschiedener Funktionen Zytokin-aktivierter trophoblastärer Zellen untersucht werden.

### ***Methodik***

Sechs verschiedene Chorionkarzinom- (JEG-3, JAR, JAR-SOCS3-shRNA), Trophoblast- (HTR8/SVneo) und Trophoblast-Hybridzelllinien (ACH-3P, AC1-M59) sowie primäre isolierte I. und III. Trimester Trophoblastzellen wurden auf die Expression von 2 PIAS-Isoformen (PIAS1 und PIAS3), sowie STAT1 und STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription) untersucht und im Bezug auf ihre funktionelle Eigenschaften verglichen.

Im Folgenden wurde mittels RNA-Interferenz ein effizienter „Knockdown“ von PIAS etabliert. Mit verschiedenen funktionellen Assays wurde der Einfluss dieses „Knockdowns“ auf Proliferation, Migration und Invasion der Zellen untersucht.

Die Lokalisation von PIAS und pSTAT3 in der Plazenta und in verschiedenen Zelllinien sowie der Einfluss des „Knockdowns“ wurden mittels Immunhisto- und Immunzytochemie analysiert.

## **Ergebnisse**

Bei einer Reihe von Chorionkarzinom- und Trophoblast-Zelllinien (JAR, JAR-SOCS3-shRNA, HTR8/SVneo) wurde die Expression von beiden PIAS-Isoformen (PIAS1 und PIAS3) nachgewiesen, während bei den anderen Zelllinien (JEG-3, ACH3P, AC1M59) und bei den primären isolierten Trophoblastzellen nur PIAS1 vorkam. Bei PIAS3-positiven Zelllinien wurde eine höhere STAT3-Expression ( $\alpha$  und  $\beta$ ) demonstriert, während die PIAS3-negativen Zelllinien mehr STAT1( $\alpha$  und  $\beta$ ) exprimieren.

Mittles Immunhis- und Immunzytochemie konnte gezeigt werden, dass die PIAS-Expression im invasiven extravillösen Trophoblast des ersten Trimenons geringer ist als im villösen Trophoblast und im Trophoblast des dritten Trimenons.

Bei einer weiteren immunzytochemischen Analyse ließ sich ein kernbetontes pSTAT3-Signal bei PIAS3-positiven Zelllinien beobachten, während in PIAS3-negativen Zellen das Signal gleichmäßig zwischen dem Kern und dem Zytoplasma verteilt war.

Bei dem „Knockdown“ von PIAS zeigte sich eine verstärkte STAT3-Phosphorylierung und ein verstärktes pSTAT3-Signal in den Zellkernen, sowie eine verstärkte STAT-Aktivität der Zellen, in Bezug auf erhöhte Proliferations-, Migrations- und Invasionsrate.

## **Schlussfolgerungen**

Die PIAS Isoformen sind in verschiedenen Trophoblast-, Chorionkarzinom-, Trophoblasthybridzelllinien, sowie in primären isolierten Trophoblastzellen aus I. und III. Trimester Plazenta nachzuweisen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass PIAS an der negativen Regulation der STAT-vermittelten Funktionen der trophoblastären Zellen beteiligt ist. Andererseits spricht die Korrelation der Anwesenheit von PIAS3 mit der höheren funktionellen Aktivität der Zellen dafür, dass PIAS3 als möglicher molekularer Marker für die Invasivität der Zellen angesehen werden könnte. Die Gesamtbetrachtung der vorliegenden Ergebnisse lässt vermuten, dass PIAS ein weiterer und bis jetzt unbekannter Baustein der Regulation der Funktion von trophoblastären Zellen ist.

## 2. Einleitung

### 2.1 Schwangerschaft – die Entstehung eines neuen Lebens

Die Schwangerschaft (medizinisch Gestation oder Gravidität, von lateinisch *gravitas*, „Schwere“) bezeichnet in der Medizin den Zeitraum von der Befruchtung der Eizelle bis zur Geburt des Kindes (Pschyrembel, 1993).

### 2.2 Von der Ovulation bis zur Implantation

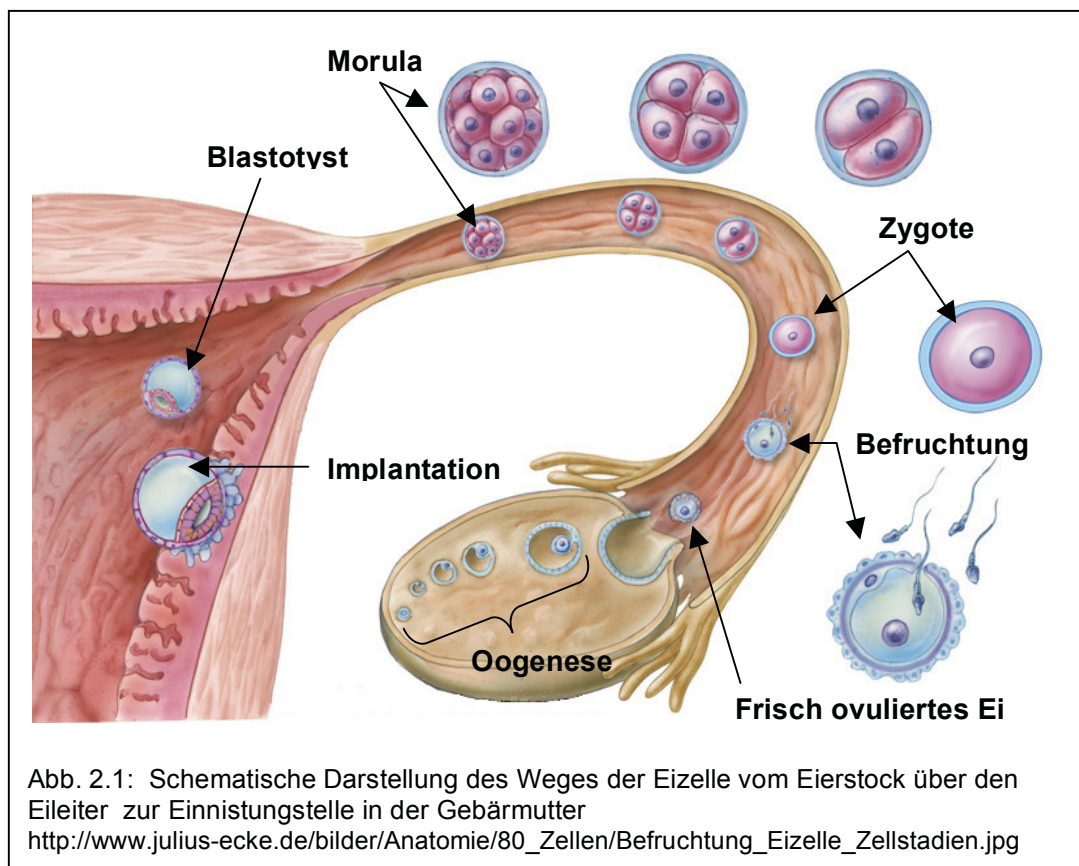
#### 2.2.1. *Die Ovulation, die Konzeption und die Entwicklung der Blastozyste*

Von der Pubertät an (zwischen 12. und 15. Lebensjahr) spielen sich am weiblichen Organismus während des gesamten fortpflanzungsfähigen Alters monatlich zyklische Veränderungen an den Ovarien, am Uterus, an den Tuben, der Vagina und den Brustdrüsen ab. Im Idealfall dauert der menstruelle Zyklus 28 Tage, wobei die Schwankungen von  $\pm 3$  Tagen als normal auszusehen sind. Diese Schwankungen sind auf eine unterschiedlich dauernde 1. Zyklusphase zurückzuführen, d.h. die Reifung der Follikel variiert individuell. In jedem Zyklus werden die Fortpflanzungsorgane erneut auf eine eventuelle Schwangerschaft vorbereitet (Keith L. Moore, T. Vidhya N. Persaud, 2007).

Die zyklischen Veränderungen werden durch den hypothalamisch-hypophysär-ovariellen Regelkreis gesteuert. Neurosekretorische Zellen des Hypothalamus synthetisieren das gonadotropinfreisetzende Hormon (*GnRH – gonadotropin releasing hormone*). GnRH stimuliert die Freisetzung von zwei hypophysären Hormonen, deren Zielorgane die Ovarien sind. Das follikelstimulierende Hormon (FSH) regt die Entwicklung der Ovarialfollikel an und steuert die Produktion von Östrogen durch die Follikelepithelzellen. Das luteinisierende Hormon (LH) löst die Ovulation aus und stimuliert in den Follikelepithelzellen und den Zellen des *Corpus luteum* die Produktion von Progesteron.

Entsprechend dem jeweils vorherrschenden Blutspiegel dieser beiden Hormone wird die Hälfte des Zyklus auch als Follikel- (oder Östrogen-) Phase und die zweite Hälfte auch als Luteal- (oder Progesteron-) Phase bezeichnet. Beide Hormone beeinflussen zusätzlich das Wachstum des Endometriums und führen dort zur Unterscheidung der Proliferationsphase von der Sekretionsphase (Abschnitt 2.2.2).

Um die Mitte der Follikelphase des Menstruationszyklus (14. Tag des Zyklus) kommt es zur Freisetzung einer befruchtungsfähigen Oozyte. Die Ovulation erfolgt ca. 10h nach dem maximalen LH-Gipfel durch Zunahme der Follikelflüssigkeit sowie den enzymatischen Abbau der Follikelwand. Diese Freisetzung erfolgt direkt in den Eileiter (Abb. 2.2.1), wo für eine erfolgreiche Schwangerschaft innerhalb von 24 bis 48 Stunden eine Befruchtung stattfinden muss (Kliman, 1998).



Direkt nach der Ovulation entsteht das *Corpus luteum*, das hauptsächlich Progesteron, sowie etwas Östrogen sezerniert und eine starke Vaskularisation aufweist. Das Progesteron bewirkt, daß das Endometrium auf die Implantation der Blastozyste vorbereitet wird (Abschnitt 2.2.2.). Unter dem Einfluss von hCG (*humanes Choriongonadotropin*) wird das *Corpus luteum* zum *Corpus luteum gravidatis* umgewandelt, das bis zur 20. SSW funktionsfähig bleibt. Danach übernimmt die Plazenta die Produktion von Östrogen und Progesteron, die für die Erhaltung der Schwangerschaft notwendig sind. Findet keine Konzeption statt, geht das *Corpus luteum* (in diesem Fall *Corpus luteum menstruationis* bezeichnet) nach 14 Tagen zugrunde (Luteolyse). Es entsteht ein weißliches Narbengewebe: *Corpus albicans*.

Die Vereinigung von der Eizelle und dem Spermium - die Befruchtung- findet in der Regel im ampullären Anteil der Tube (*Ampulla tubae*) statt. Der gesamte Vorgang dauert etwa 24h und verläuft in mehreren Schritten. Zusammengenommen sollen mit den Einzelschritten zwei grundsätzlich verschiedene Ziele erreicht werden: die Vereinigung eines einzelnen Spermiums mit der Eizelle und die Aktivierung der Eizelle zur Vollendung der Meiose und zum Start der ersten Schritte der embryonalen Entwicklung. Obwohl mehrere Spermien versuchen, in die *Corona radiata* und die *Zona pellucida* einzudringen, gelangt doch normalerweise nur ein Spermium zur Befruchtung in die Eizelle. Das Eindringen weiteren Spermien wird durch die sogenannte kortikale Reaktion verhindert (Polyspermieblock). Danach erfolgt die Verschmelzung der beiden haploiden Chromosomensätze von Eizelle und Spermienkopf (Konjugation), die zur Entstehung einer Zelle mit 46 Chromosomen (Zygote) bringt (Abb. 2.1). Die chromosomalen Abberationen, die dabei auftreten können, führen zu den verschiedenen Komplikationen der Schwangerschaft.

Während des Transports durch die Tube in das Uteruskavum macht die Zygote eine Reihe rasch aufeinanderfolgender mitotische Zellteilungen ohne Zellwachstum durch und wird dadurch in mehrere Blastomeren unterteilt (Abb. 2.1). Der Eintritt der Zygote in den Uterus erfolgt nach 3 Tagen als Morula (32-Zell-Stadium) (Sadler, 1998). Die außen gelegenen Blastomere exprimieren Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasen, die nach ihrer Aktivierung Natrium und Wasser in die Morula transportieren, die damit zur Blastozyste wird. Dadurch entsteht eine Höhle mit zwei abgrenzbaren Zellhaufen: Embryoblast (zentral) und Trophoblast (außen). Aus dem Embryoblasten wird der Embryonalkörper. Aus dem Trophoblasten entwickeln sich Plazenta und Chorion (Watson, 1992).

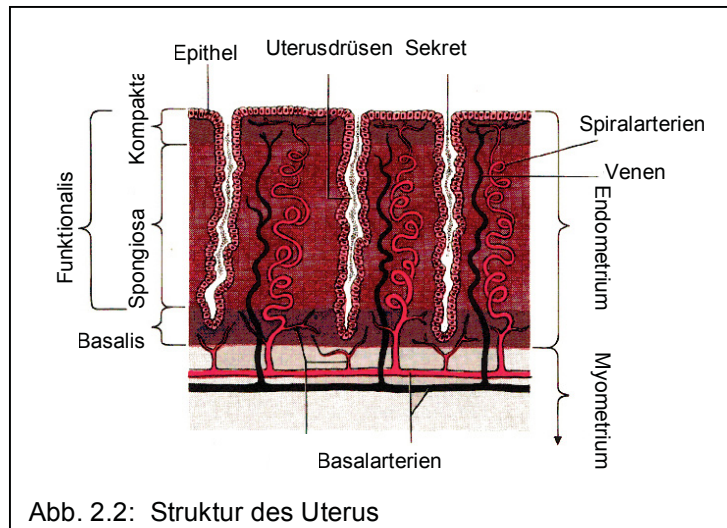
Die Blastozyste liegt etwa zwei Tage frei in der Uterushöhle und ernährt sich von der Sekretion der Uterusdrüsen. Die *Zona pellucida* wird langsam aufgelöst. Anschließend beginnt die Implantation der Blastozyste in das Bindegewebe der Uterusschleimhaut (Moore, 2007).



### 2.2.2 Vorbereitung des Uterus auf die Implantation

Die Wand des Uterus besteht aus drei Schichten (Abb. 2.2): dem Perimetrium, einer dünnen äußeren Schicht, dem Myometrium, einer dicken Schicht glatter Muskulatur, und dem Endometrium, einer dünnen inneren Schicht. Während der Sekretionsphase

des Zyklus kann man mikroskopisch drei endometriale Schichten unterscheiden: eine dünne oberflächliche Kompakta (Stratum compactum), bestehend aus dichtem Bindegewebe, eine dicke Spongiosaschicht (Stratum spongiosum), die aus ödematösem Gewebe mit

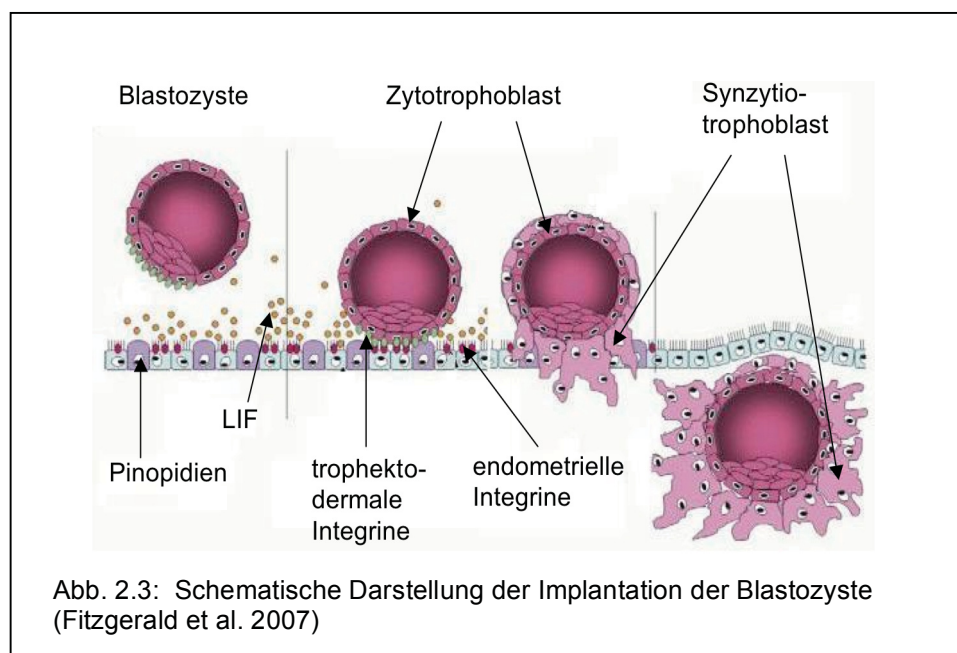


eingelagerten erweiterten und gewundenen Drüsenschläuchen besteht und eine dünne Basalschicht (Stratum basale), in der die Endabschnitte der Uterusdrüsen liegen. Die Basalschicht hat eine eigene Blutversorgung und wird während der Menstruation nicht abgestoßen. Die Kompakta und die Spongiosa werden zusammen als funktionale Schicht (Funktionalis, Stratum functionale) bezeichnet. Nur in dieser Letzten laufen während des menstruellen Zyklus und nach der erfolgreichen Befruchtung der Eizelle endometriale Umbauvorgänge ab. Dabei stehen die zyklischen hormonellen Schwankungen in enger Beziehung zur endometrialen Reaktion. Östrogene bewirken die Proliferation des Endometriums. Das Endometrium verdickt sich und der Wassergehalt des Gewebes steigt an. Die Drüsen vermehren sich und wachsen in die Länge, die Spiralarterien verlängern sich ebenfalls. Unter dem kombinierten Einfluss von Östrogenen und Progesteron erfolgt die sekretorische Transformation. Das vom Corpus luteum gebildete Progesteron regt die Uterusdrüsen zur Abgabe eines glykogenreichen Sekrets an (Santoro, Goldsmith et al. 2000). Die Spiralarterien wachsen bis an die oberflächlichen Schichten der Schleimhaut heran und knäueln sich zunehmend auf. Das venöse Netzwerk erweitert sich und bildet große Lakunen. Direkte arteriovenöse Anastomosen sind charakteristisch für diese Phase. Darüber hinaus kommt es zu einem drastischen Anstieg uteriner Natürlicher Killerzellen (NK-Zellen). Diese

regulieren die Implantation durch Interaktion mit Trophoblastzellen und Stromazellen, was zur Modulation der Dezidua führt (Parham, 2004). Durch diese Dezidualisierung werden alle Bedingungen für eine erfolgreiche Implantation der Blastozyste gegeben. Dieser Phase folgt im Falle der Befruchtung und Implantation die Dezidualisation, oder bei ausbleibender Konzeption, die den Zyklus beendende Menstruation.

### 2.2.3 Implantation

Zwischen Tag 20 und Tag 24 eines 28-tägigen weiblichen Zyklus (5.-6. Tag der Befruchtung) befindet sich ein so genanntes Implantationsfenster. Während dieses Zeitraums ist ein fein regulierter Prozess – die Implantation – möglich (Murray, Lessey 1999). Anfangs lagert sich die Blastozyste an das Endometrium an, was über die Interaktion zwischen den Pinopodien, den kleinen Ausstülpungen des Uterusepithels, und den Mikrovilli auf der Oberfläche der Blastozyste vermittelt (Abb. 2.3) (Fitzgerald et al, 2007). Diese Wechselwirkung wird durch die sowohl endometrialen, als auch von Trophoblastzellen an der Oberfläche der Blastozyste exprimierten Integrine bzw. Selectine stabilisiert. Nach der Adhäsion der Blastozyste an die Dezidua erfolgt die Einnistung ins Uterusepithel und an die Basalmembran. Diese wird durch von Trophoblast exprimierten Matrixmetalloproteinasen (MMP) vermittelt.



Die Blastozyste produziert das  $\beta$ -hCG ( *$\beta$ -humanes Choriongonadotropin*), was die zyklische Abstoßung des Endometriums verhindert. Andererseits reguliert es wesentliche Eigenschaften der Trophoblasten wie Differenzierung und Invasion (Licht, 2001; Oktay, 1994). Die  $\beta$ -hCG -Produktion ist der erste mögliche Nachweis für eine erfolgreiche Implantation und für die Schwangerschaft (Sadler, 1998). Unter dem Einfluss von hCG wird das *Corpus luteum* zum *Corpus luteum gravidatis* umgewandelt, was die Expression des Hormons Progesteron stimuliert. Dieses ist an mehreren Prozessen (Dezidualisation, Entwicklung des Embryos, Immunosuppression usw.) beteiligt.

## 2.3 Plazentation und Invasion

### 2.3.1 Trophoblastendifferenzierung

Schon während der Implantation der Blastozyste kommen Trophoblastzellen mit den Zellen des Endometriums in Kontakt und beginnen sich zu differenzieren (Abb. 2.4).

Der innenliegende Zytotrophoblast (CTB) besteht aus einkernigen proliferationsaktiven Zellen. Man unterscheidet zwei unterschiedliche Populationen von CTB: villöse CTB (vCTB) und extravillöse CTB (evCTB). Im Gegensatz zu den unbeweglichen vCTB, sind evCTB die Vorläufer beweglicher, invasiver Epithelzellen (Staun-Ram, 2005).

Durch die Fusion dieser Zellen entsteht der außenliegende Synzytiotrophoblast (STB), eine sich rasch vergrößernde, vielkernige Zellschicht, in der keine Zellgrenzen vorkommen. Vom STB werden lytische Enzyme sezerniert, welche zum Eindringen der Blastozyste bis zum Stroma des Endometriums beitragen. Unter anderem

übernimmt der STB die Expression von  $\beta$ -hCG, welchem für eine erfolgreiche Schwangerschaft essentiell ist (Fitzgerald et al, 2007). Der STB und der vCTB bilden

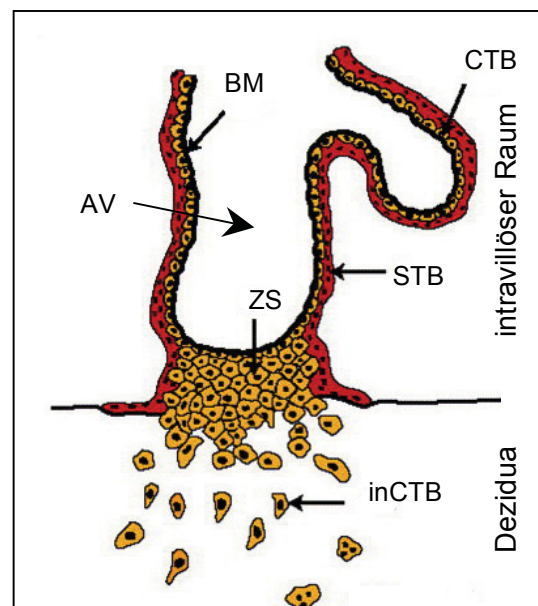


Abb.2.4: Trophoblastdifferenzierung  
(Pollheimer et al. 2005)

AM: *anchoring villi*

BM: Basalmembran

ZS: cell columns

CTB: Zytotrophoblast

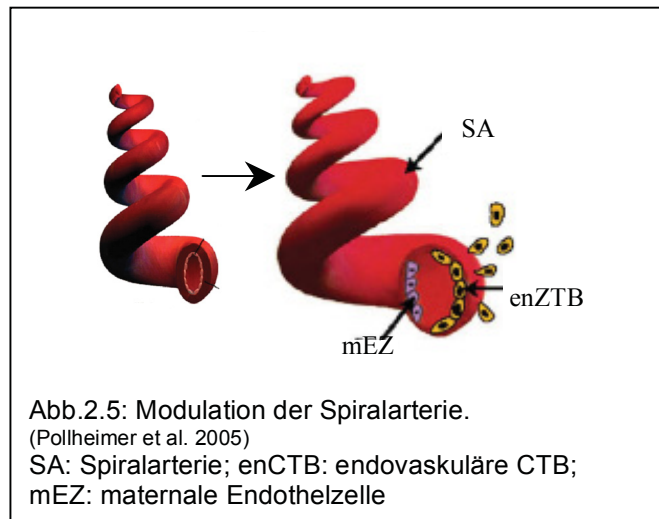
STB: Synzytiotrophoblast

inCTB: interstitielle Zytotrophoblast

zusammen zwei Arten von Zotten: die im mütterlichen Blut flottierenden Chorionzotten (*floating villi*) und die die Blastozyste im Uterus verankernden Haftzotten (AV) (*anchoring villi*) (Abb. 2.4). Die Ersten dienen zum feto-maternalen Stoffaustausch, während die Zweiten den Kontakt mit der Dezidua herstellen. Beide bestehen aus einer äußeren STB-Schicht, die den einschichtigen vCTB bedeckt (Bischof et. al, 2005).

Der evCTB durchwandert die STB-Schicht der Zotten, beginnt aktiv zu proliferieren, bildet sogenannte Zellsäulen (ZS) (*cell columns*) und nimmt Kontakt zur dezidualisierten Schicht des Endometriums auf (Feinberg et al. 1991, Kliman & Feinberg 1992, Pollheimer, 2005). In weiteren Stadien der Invasion unterscheidet man zwei Typen des evCTB: der endovaskuläre CTB (enCTB) und der interstitielle CTB (inCTB). Der inCTB invadiert invasiv in das mütterliche Endometrium und das proximale Drittel des Myometriums.

Hier bewirkt er den Abbau der glatten Muskulatur der Spiralarterien und deren Ersetzung durch Fibrinogen (Aplin, 1991; Lunghi, 2007). Der enCTB invadiert seinerseits in die mütterlichen Spiralarterien, adhärirt an Endothelzellen, bildet Pseudopodien aus und wandert das Gefäßlumen



entlang. So wandeln diese fetalen Zellen die uterinen Gefäße in ein System um, das es ermöglicht, eine beträchtliche Menge mütterlichen Blutes dem inter-villösen Raum zuzuführen (Abb.2.5) (Damsky, 1998).

### 2.3.2 Die Invasion der Trophoblasten und deren Regulation

Die Fähigkeit zur Invasion ist eine phänomenale Parallele zwischen Trophoblast- und Tumorzellen (Fitzgerald, 2005a). Im Gegensatz zum unkontrollierten Wachstum und der Invasion der Krebszellen, ist die Invasion der Trophoblastzellen in das endometriale Stroma ein präzise regulierter Prozess, der zeitlich und räumlich begrenzt ist (Murray MJ, 1999; Koldovsky U., 1999; Bishop, 2000). Diese Regulationsmechanismen sind Gegenstand intensiver wissenschaftlicher

Forschungen. Der Schwerpunkt liegt dabei auf dem Verständnis des Mechanismus der Kontrolle der Trophoblasteninvasion in der Plazenta, da die Placenta als ein physiologisches Tumormodel angesehen werden kann. Außerdem ist die Rolle dieses Mechanismus bei Komplikationen in der Schwangerschaft, wie Präeklampsie oder Molenbildung, sowie Chorionkarzinomen noch unklar.

### Adhäsionsmoleküle und Extrazelluläre Matrix

Adhäsionsmoleküle sind transmembranöse Glykoproteine, die eine Schlüsselrolle im Rahmen der Ausbildung zellulärer Architektur und Differenzierung spielen und sowohl Zell-Zell- als auch Zell-Matrix-Verbindungen vermitteln. Im Hinblick auf maligne Prozesse sind sie von großer Bedeutung, weil gerade diese Verbindungen Unregelmäßigkeiten in neoplastischen Zellen aufweisen (Pignatelli & Vessey 1994).

Integrine gehören zu einer von fünf verschiedenen Familien von Adhäsionsmolekülen. Sie werden hauptsächlich an der Zelloberfläche exprimiert und bestehen aus nicht-kovalent gebundenen  $\alpha\beta$ -Heterodimeren. Sie finden sich hauptsächlich in epithelialen Zellen und Kollagen-, Laminin- und Fibronectin-vermitteln Zell-Matrix-Verbindungen. Die obengenannten sind Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM).

Sowohl schon bei der Implantation der Blastozyste, als auch bei der Invasion und Migration der Trophoblastzellen spielen Integrine eine wichtige Rolle. Sie fungieren auf der Zelloberfläche der Trophoblasten als Rezeptoren mit unterschiedlichen Bindungsspezifitäten. Die Entwicklung und das Verhalten von Zellen werden durch die Bindung deren Integrine an die EZM beeinflusst (Lin, 1993).

So spielt eine veränderte Bindung von EZM-Bestandteilen als Folge einer aberranten Integrin-Expression eine wichtige Rolle bei der Transformation der vCTB zu evCTB (Damsky, 1994). Die vCTB exprimieren ausschließlich Laminin-bindende Integrine. Dadurch ist die Fähigkeit von vCTB an der Laminin-haltigen Basalmembran der beteiligten Villi zu verankern bedingt. (Sonnenberg, 1990). Andererseits befinden sich auf der Oberfläche der evCTB neben Laminin- vor allem auch Fibronectinrezeptoren. Die Fähigkeit zu migrieren erlangen die evCTB durch die Expression der Fibronectin-bindenden Integrine, wobei die Rezeptordichte mit dem invasiven Verhalten der Trophoblasten korreliert. In vitro Studien zeigen, dass nicht nur die dezidualen Stromazellen, sondern auch die evCTB Fibronectin synthetisieren und somit ihr invasives Verhalten zum Teil selbst regulieren (Burrows, 1993).

### Matrix-Metalloproteinasen und deren Inhibitoren

Allein die Anwesenheit von Fibronektin reicht für eine erfolgreiche Migration und Invasion nicht aus. Zusätzlich müssen Bestandteile der extrazellulären Matrix, welche die Wanderung der evCTB behindern, degradiert werden. Hierzu dienen die Expression und Sekretion verschiedener Proteasen, wobei die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) eine besondere Rolle spielen.

MMPs gehören zu den zinkabhängigen Endopeptidasen und liegen im inaktiven Zustand als Zymogene vor. Durch eine Peptidabspaltung entsteht die aktive Form, die in der Lage ist, sowohl die extrazelluläre Matrix als auch die Basalmembran enzymatisch abzubauen (Staun-Ram et al. 2004). MMPs werden in 3 Gruppen eingeteilt: Kollagenasen, Gelatinasen und Stromelysine.

Da MMPs aufgrund ihrer Spezifität nur bestimmte Bestandteile der extrazellulären Matrix degradieren, wird die Struktur der Matrix weitgehend bewahrt. Die Zellwanderung der evCTB wird aber dadurch erleichtert (Alberts, 2004).

In Tumorgewebe wie auch bei Trophoblastzellen findet man vor allem MMP-2 und MMP-9. Beide Enzyme sind in der Lage, Kollagen IV, Bestandteil der EZM und Hauptbestandteil von Basalmembranen, abzubauen und somit das Uterusepithel als entscheidende Barriere während der Implantation der Blastozyste zu durchbrechen (Librach et al. 1991).

Um eine unkontrollierte Invasion der Trophoblastzellen zu vermeiden, muss die Aktivität der MMP genau reguliert werden. Diese Regulierung erfolgt durch die Gewebeinhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen (tissue inhibitors of MMPs, TIMP 1-4), welche an das katalytische Zentrum der MMPs binden und diese dadurch inhibieren (Niu et al. 2000). Somit wird der weitere Abbau von Bestandteilen der extrazellulären Matrix verhindert und auch die Trophoblastenmigration gehemmt (Burrows, 1996).

Die TIMP werden sowohl von embryonalen, als auch von den dezidualen Zellen gebildet (Hurskainen et al. 1996), was zum einen für eine Selbstregulation der Trophoblasten und zum anderen auch für die Rolle des uterinen Stromas als Barriere für unkontrollierte Invasion spricht (Staun-Ram, 2005).

Im Verlauf der Schwangerschaft sind unterschiedliche Expressionsmuster von MMP-2 und MMP-9 zu beobachten. Während zu Beginn des ersten Trimesters die MMP-2-Konzentration sehr hoch ist, nimmt zum Ende des ersten Trimesters die



Konzentration ab und MMP-9 wird stärker exprimiert (Fitzgerald et al. 2005; Staun-Ram, Shalev, 2005).

Die transkriptionelle Regulierung erfolgt durch Zytokine und Wachstumsfaktoren.

## 2.4 Dysregulationen und Störungen

Die genaue Regulation von Proliferation und Invasion der Trophoblasten ist eine wesentliche Voraussetzung normal verlaufender Schwangerschaften. Fehlregulationen dieser Prozesse können zu einem weiten Spektrum von Pathologien führen. Dieses Spektrum reicht von relativ häufigen Befunden wie Plazentationsstörungen und der sich hieraus entwickelnden Präeclampsie, über Fehlgeburten und frühzeitige Plazenta-Ablösungen bis hin zu selteneren Krankheitsbildern wie der Blasenmole und das Chorionkarzinom.

### 2.4.1 Sterilität und Infertilität

Definitionen der Sterilität:

- Primäre Sterilität: Keine Schwangerschaft innerhalb von 1 Jahr bei regelmäßigem, ungeschütztem Geschlechtsverkehr.
- Sekundäre Sterilität: Keine weitere Schwangerschaft nach einer oder mehreren vorausgegangenen Graviditäten und erneuten Kinderwunsch.

Definition der Infertilität:

- Unvermögen, eine Schwangerschaft bis zur Lebensreife eines Kindes auszutragen, obwohl eine Empfängnis (Konzeption) möglich ist.
- Als Gründe für die weibliche Sterilität sind vor allem endokrine, tubare, uterine, zervikale oder vaginale Ursachen zu nennen.

### 2.4.2 Fehlgeburt

Abort oder Fehlgeburt – Schwangerschaft, die vor Erreichen der Lebensfähigkeit des Kindes zum Ende kommt. Bei drei oder mehr aufeinander folgenden Fehlgeburten spricht man von habituellen Aborten. Mehrere Ursachen wie embryonale Entwicklungsstörung und Störung der Plazentation, Störung der Follikelreifung und ungünstige Progesteronbildung, Nidations- und Implantationsstörungen, insuffiziente Implantation und Autoimmunerkrankungen können zu den Fehlgeburten führen.

### 2.4.3 Präeklampsie

Die Präeklampsie ist eine multifaktorielle Erkrankung, die in 5–10% aller Schwangerschaften auftritt und eine der Hauptursachen maternaler, fetaler und neonataler Morbidität und Mortalität, sowie für etwa 25% der Frühgeburten verantwortlich ist. Die Präeklampsie ist definiert durch das Auftreten einer Hypertonie und einer Proteinurie mit oder ohne Ödeme nach der abgeschlossenen 20. SSW. Je früher in der Schwangerschaft die Symptome auftreten, umso schwerer ist die Erkrankung (Early-onset-Präeklampsie).

Die Präeklampsie wird heute als eine 3-Stufen-Erkrankung angesehen:

- Störung der Implantation und Plazentation in der Frühschwangerschaft
- Hypoxie des Trophoblasten infolge von Perfusionsstörung
- endoteliale Dysfunktion im peripheren mütterlichen Kreislauf

Eine verminderte Invasion des Zytrophoblasten in das maternale plazentare Gefäßbett und verminderte Transformation der uterinen Spiralarterien führt zu einer Minderperfusion der Plazenta und zu einem Ungleichgewicht zwischen der Freisetzung von Sauerstoffradikalen und den antioxidativen Schutzmechanismen des mütterlichen Organismus. Der resultierende oxidative Stress bewirkt zusammen mit der inflammatorischen Reaktion in der fetomaternalen Grenzzone über die Freisetzung einer Vielzahl verschiedener Mediatoren eine generalisierte Dysfunktion des Endothels im mütterlichen Kreislauf (Redman u. Sargent 2000). Pathophysiologische Folge der Endotheldysfunktion ist die Ausprägung der klinischen Symptomatik mit Schäden von fast allen Organ-Systemen.

Aktuell werden eine Vielzahl von proinflammatorischen Zytokinen und biologischen Markern untersucht (Angiogenesefaktoren VEGF und sein löslicher Rezeptor sFlt1,



PIGF oder Endoglin sowie Plazentaproteine wie das PP13), die am aussagekräftigsten hinsichtlich der Prognose für eine schwere Präeklampsie zu sein scheinen (Levine RJ, 2004; Torry DS, 2003; Bersinger NA, 2004; Krauss T, 2004; McInnes R, 2003). In letzter Zeit haben auch vesikuläre Plasmamembranfragmente, die bei Präeklampsie vermehrt von der Trophoblastoberfläche der Plazentazotten an den mütterlichen Kreislauf abgegeben werden, besondere Aufmerksamkeit erregt (Kniegt et al. 1998; Redman u. Sargent 2003; Gupta et al. 2005).

#### *2.4.4 Trophoblastentumoren*

##### Blasenmole

Die Blasenmole (*Mola hydatidosa*) ist eine nicht bösartige Trophoblastenwucherung, die jedoch in eine destruierende, metastasierende Blasenmole oder Chorionepitheliom (Chorionkarzinom) übergehen kann.

Die Blasenmole tritt als partielle oder komplette auf. Die partielle Blasenmole ist meistens triploid (69XXY oder 69XXX) und entsteht durch gleichzeitige Befruchtung einer defekten Eizelle mit 2 Spermatozoen (Dispermie). Die komplette Blasenmole entsteht durch eine defekte Keimanlage mit Verlust des Zellkerns (damit Verlust des genetischen Materials der Mutter) und Verdoppelung des eingedrungenen väterlichen Chromosomensatzes (90% - 46XX-homozygot, 10% - 46XY-heterozygot). Makroskopisch ist die Blasenmole durch die Ausbildung traubenförmig angeordneter Bläschen gekennzeichnet. Bei der kompletten Blasenmole fehlt in den meisten Fällen der Embryo. Im Gegensatz zu der vollständigen Blasenmole ist der Fetus bei einer partiellen Blasenmole immer vorhanden, wobei die meisten Schwangerschaften als Abort enden.

Bei der Unfähigkeit des mütterlichen Organismus die Proliferation des malign veränderten Trophoblasten zu begrenzen, entsteht eine destruierende Blasenmole. Die physiologischen Vorgänge der Implantation persistieren, das Trophoblastgewebe durchdringt das Myometrium und erreicht ggf. auch extrauterine Gewebe.

##### Chorionkarzinom

Bei dem Chorionkarzinom handelt es sich um eine maligne Transformation des proliferierenden Trophoblastgewebes mit z.T. hoher Metastasierungstendenz. Die Trophoblasten, aus denen es besteht, befinden sich noch im prä-villösen Stadium und sind nicht imstande sich weiter zu differenzieren. Das Chorionkarzinom ist ein stark hormonaktiver Tumor und produziert hCG. Es metastasiert in die Lunge und in die Leber (Shih, 2002) sowie, meist jedoch im Finalstadium, in das Gehirn. Die Ursache des Chorionkarzinoms ist unbekannt. Es entstehthäufiger nach Molenschwangerschaften (50% aller Chorionkarzinome entwickeln sich nach Blasenmolen), Aborten und Extrauteringraviditäten, tritt jedoch auch nach normalen Schwangerschaften auf. Während in entwickelten Industriestaaten ein Chorionkarzinom pro 20.000 bis 40.000 Schwangerschaften auftritt, liegt die Häufigkeit in Asien bei 2:1.000 (Horn, 2003). Das Chorionkarzinom ist auf die Chemotherapie mit Methotrexat empfindlich. Selbst im Stadium der frühen Metastasierung ist eine Heilung möglich.

## 2.5 Zytokine und Wachstumsfaktore in der Schwangerschaft

Zytokine sind eine Gruppe von diversen löslichen Proteinen (meistens Glykoproteinen), welche als humorale Regulatoren in nano- und picomolaren Konzentrationen wirken. Im Gegensatz zu Hormonen werden Zytokine nicht in spezifischen Drüsen, sondern meist in einer Vielzahl von unterschiedlichen Zellen und Geweben produziert. Zytokine spielen eine wichtige Rolle bei der interzellulären Kommunikation und regulieren Wachstum und Differenzierung zahlreicher Zellen. Da Zytokine auf viele verschiedene Zielzellen einwirken können, bezeichnet man sie als pleiotrop.

Während der Schwangerschaft werden alle Prozesse, schon von der Implantation der Blastozyste und bis zur Geburt des Kindes, von zahlreichen Zytokinen, Hormonen und Wachstumsfaktoren beeinflusst (Garbisa et al. 1993; Heinrich et al. 1998; Adams & Antczak, 2001; Poehlmann et al. 2004). Diese stammen sowohl von maternalen, als auch von embryonalen Zellen. Diese Regulation stellt einen hoch komplexen Prozess dar. Während beispielsweise IL-1 (Interleukin-1) und EGF (epidermal growth factor) die Implantation der Blastozyste beeinflussen (Sharkey, 1998; Simón, 1994), wird das Verhalten der Trophoblasten von anderen Zytokinen und Wachstumsfaktoren reguliert. So stimulieren HGF (hepatocyte growth factor) und

GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor) beispielsweise die Proliferation, IGF-2 (insulin-like growth factor-2) die Migration der Trophoblasten (Fitzgerald et al. 2005; Hamilton et al. 1998). Auch die Invasion der Trophoblasten wird streng unter anderem von IL-6, IGF-2, TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) und LIF (leukemia inhibitory factor) reguliert (Staun-Ram et al. 2005). Letzterer ist auch für die gesamte Schwangerschaft von besonderer Bedeutung (Fitzgerald et al. 2007).

### *2.5.1 Leukemia Inhibitory Factor (LIF)*

LIF ist ein 58 kD großes und 179 Aminosäuren langes pleiotropes Glykopeptid mit diversen Effekten in verschiedenen Organsystemen. LIF wurde ursprünglich durch seine Fähigkeit charakterisiert, die Proliferation von Leukämie-Zellen in vitro zu inhibieren und die Zellen zu einem Makrophagen-ähnlichen Zelltyp zu differenzieren (Gearing et al. 1987).

Viele Studien belegen, dass LIF für eine normale Schwangerschaft unerlässlich ist. Es wurde gezeigt, dass LIF eine wichtige Rolle für die Entwicklung und Implantation der Blastozyste, sowie für die Regulation der Trophoblastdifferenzierung und der weiteren Plazentation spielt. (Kimber et al. 2005; Vogliagis D et al. 1999; Stewart CL et al. 1997). In der Schwangerschaft wird LIF sowohl von embryonalen, als auch von endometrialen Zellen exprimiert und sekretiert, wobei die maximale LIF-Expression während der Implantation der Blastozyste auftritt (Kondera-Anasz Z, et al. 2004; Cullinan EB et al. 1996; Bhatt H et al. 1991).

Es konnte gezeigt werden, dass bei LIF-defizienten Mäusen ohne LIF eine Implantation der bis dahin regelrecht entwickelten Blastozyste nicht möglich ist. Die Fruchtbarkeit konnte aber mit einer LIF-Injektion in den Uterus wiederhergestellt werden (Stewart CL et al., 1992; Cheng et al. 2002). Es konnte auch nachgewiesen werden, dass die Frauen mit unklarer Infertilität signifikant niedrigere Konzentrationen an LIF aufweisen, als fruchtbare Frauen (Laird et al. 1997).

Die Anwesenheit von LIF- Rezeptoren auf trophoblastären Zellen spricht für die Rolle von LIF in der Regulation der Trophoblastfunktion (Kojima K et al. 1995). Die die LIF-induzierten Effekte bezüglich des Invasionsverhaltens der Trophoblasten kontrovers diskutiert. Zum einen konnte gezeigt werden, dass LIF durch die Stimulierung der MMP-Expression die Invasion von Trophoblastzellen fördert

(Poehlmann et al 2005; Sunder et al. 2000; Fitzgerald et al. 2005a; Morrish et al. 1998), während andere Autoren eine Hemmung der Invasion durch LIF beschreiben (Bischof et al. 1995).

Gleichzeitig wurde die stimulierende Rolle von LIF in der Regulation der Proliferation und Invasion der Chorionkarzinom- und anderen Tumorzellen nachgewiesen (Kamohara H et al. 2007; Wysoczynski M et al. 2007).

Ungeachtet dieser Kontroversen, sprechen alle Ergebnisse für eine essentielle Rolle von LIF für den normalen Ablauf der Schwangerschaft.

### 2.5.2 Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 ist ein proinflammatorisches Zytokin mit einem Molekulargewicht von 21 Da und besteht aus einer nicht-glykosylierten Polypeptidkette mit 185 Aminosäuren.

IL-6 ist an der Akutphase-Reaktion des Körpers, an der Hämatopoese, sowie an der Differenzierung und dem Wachstum von B- und T-Zellen beteiligt (Heinrich et al. 2003). IL-6 spielt pathophysiologisch eine wichtige Rolle bei der Entstehung verschiedener entzündlicher Erkrankungen wie z.B. Multipler Sklerose, entzündlichen Darmerkrankungen, Rheumatoider Arthritis, und Arteriosklerose (Madhok et al. 1993, Akira et al. 1993, Schieffer et al. 2004). Es gibt allerdings auch Hinweise auf eine Funktion in der Tumorgenese. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von IL-6 im Serum von Krebspatienten mit einem höheren metastasierenden Potenzial von Krebszellen korrelieren kann. IL-6 steigert die Invasivität von Kopf-und Hals-Tumor-Zellen (Nishino H et al. 1998) und auch von Eierstock-Krebs-Zellen (Obata NH et al. 1997).

Außerdem reguliert IL-6 wichtige maternale endokrine Funktionen und spielt auch eine wichtige Rolle bei der Regulation der Implantation und Invasion der trophoblastären Zellen während der Schwangerschaft. IL-6 ist im Fruchtwasser in der Frühschwangerschaft zu finden und wird durch Trophoblastzellen produziert (Jauniaux E et al. 1996). Die Konzentration von IL-6 hat einen zyklischen Verlauf. Der höchste Spiegel ist während der Sekretionsphase, des Zeitfensters einer möglichen Implantation zu sehen (Tabibzadeh et al. 1995). IL-6 erhöht die Sekretion von hCG aus Trophoblastzellen, wobei die Konzentration von IL-6 positiv mit dem Gestationsalter korreliert.

Die invasiven CTB-Zellen produzieren eine höhere Konzentration von IL-6 (Das C et al. 2002). Dadurch steigt die Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9 (MMP-2, MMP-9), durch welche Trophoblastzellen ihr lokales Invasionspotential in das endometriale Stroma erhöhen (Meisser A et al. 1999).

Das menschliche Endometrium ist eine wichtige Quelle von IL-6 (Tabibzadeh S et al. 1995; Vandermolen DT et al. 1996), während der IL-6-Rezeptor gleichzeitig auf maternaler (endometriale Epithelzellen) und fetaler Oberfläche (Trophoblast und Blastozyste) sowohl während der Implantation als auch während der Plazentation zu finden ist (Tabibzadeh S et al. 1995; Sharkey AM et al. 1995; Kojima K et al. 1995).

Eine verminderte Expression von IL-6 wurde in der sekretorischen Phase im Endometrium von Frauen mit rezidivierenden Fehlgeburten gefunden (Jasper MJ et al. 2007).

### 2.5.3 Interleukin-11 (IL-11)

IL-11 ist ein weiteres Zytokin der IL-6-Zytokin-Familie. Einige Studien zeigen eine IL-11-induzierte Förderung des Proliferations- und Invasionspotentials von mehreren Tumorzellen (z.B. Brust-, Magen- und Kolorektalkarzinom). (Nicolini A et al. 2006; Nakayama T et al. 2007; Yoshizaki A et al. 2006). Zusammen mit IL-6 spielt IL-11 eine Rolle bei der Regulation der trophoblastären Implantation und Invasion. Die maximale Konzentration von IL-11 beim Menschen wurde zum Zeitpunkt der Dezidualisierung im schwangeren Uterus nachgewiesen (Dimitriadis E et al. 2000). Weibliche IL-11-negative Mäuse sind wegen defekter Dezidualisierung bzw. unkontrollierter Trophoblastinvasion unfruchtbar (Bilinski P et al. 1998). Eine Dysregulation von IL-11 und seinem IL-11R $\alpha$ -Rezeptor ist in der Gebärmutter Schleimhaut von unfruchtbaren Frauen mit Endometriose während des Implantatsfensters zu sehen (Dimitriadis E et al. 2006). Eine weitere Studie zeigt, dass das IL-11-induzierte Signal den Dezidualisierungsprozess durch die STAT3-Aktivierung stimuliert (Dimitriadis E et al. 2006).

#### 2.5.4 Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF)

Das GM-CSF ist ein Monomer aus 144 Aminosäuren mit Molekularmasse 14 kD ohne und 35 kD mit Glykosylierung. Die Bioaktivität wird durch die Glykosylierung verstärkt. Der Rezeptor besteht aus zwei ( $\alpha$  und  $\beta$ ) Untereinheiten. Nur in dieser Kombination besitzt er eine hohe Affinität zu GM-CSF (Matsuguchi et al. 1997).

GM-CSF wurde erstmals als ein Regulator für das Wachstum von Blutzellen beschrieben (Gough et al. 1984). Weiterhin wurde der Einfluß auf das Wachstum, Differenzierung und Regulation der Funktionen von Myeloblasten und Monoblasten, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen gezeigt (Demetri & Griffin, 1991; Moore, 1991). GM-CSF wird von verschiedenen menschlichen Zellen, wie z.B. T-Lymphozyten, Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten nach Einwirkung von anderen Zytokinen (IL-1, IL-2, IFN-  $\gamma$ ) produziert (Moore et al. 1991; Gough et al. 1984; Crosier et al. 1991).

GM-CSF wird chemo- und radiotherapeutisch eingesetzt, z.B. bei malignen Lymphomen (Non-Hodgkin Lymphoma), soliden Tumoren (Brustkrebs) und Knochenmarktransplantationen (Gerhartz et al. 1993; Aglietta et al. 1993).

GM-CSF fördert in vitro die Proliferation, Differenzierung und sekretorischen Aktivitäten von menschlichen und Maus-Zytotrophoblastzellen [Athanasakis I et al. 1987; Armstrong DT et al. 1989]. Damit unterstützt es auch die Entwicklung der Plazenta. Östrogene spielen eine regulatorische Rolle bei der Biosynthese von GM-CSF durch Uterus-Epithelzellen (Robertson SA et al. 1992; Imakawa Ket al. 1993; Giacomini G et al. 1995). Selbst kleine Mengen von exogenen GM-CSF können zu dramatischen Veränderungen in der Schwangerschaft bei Mäusen führen (Chaouat G et al. 1990; Tartakovsky B et al. 1991). Andererseits wurde gezeigt, dass fetales Wachstum bei GM-CSF-defizienten Mäusen durch die Schädigung der plazentaren Funktion gefährdet sein kann und dass GM-CSF für ein optimales fetales Wachstum und Überleben erforderlich ist (Robertson SA et al. 1999). In einer der Studien wurde eine erniedrigte GM-CSF-Konzentration im peripheren Blut von schwangeren Frauen mit habituellen Aborten festgestellt (Perricone R et al. 2003). Es wurde mehrfach vor allem an nicht-trophoblastären Zellen berichtet, dass GM-CSF für die Signaltransduktion den selben JAK-STAT-Signalweg verwendet wie die IL-6-Familie-Interleukine, andere Arbeiten konnten das nicht bestätigen (Fitzgerald et al. 2005).

### 2.5.5 *Hepatocyte Growth Factor (HGF)*

HGF wurde erstmals durch seine mitogene Wirkung auf Hepatozyten beschrieben (Michalopoulos et al. 1983). Heute ist es bekannt, dass es ein von vielen mesenchymalen Zellen produziertes multifunktionelles Zytokin ist. Es wurde gezeigt, dass HGF eine stimulierende Rolle bei der Mitogenese, Proliferation, Invasion und Differenzierung von Trophoblastzellen während der Entwicklung der Plazenta spielt (Stewart F et al. 1996; Kauma SW et al. 1999). Bei einem HGF-Knockdown im Maus-Modell ist eine abnorme Entwicklung der Plazenta durch eine mangelnde trophoblastäre Entwicklung zu beobachten (Uehara Y et al. 1995; Schmidt C et al. 1995). Von anderen Autoren wurde auch die antiapoptotische Rolle von HGF gezeigt (Dash et al. 2005). HGF wird von plazentaren Stromazellen produziert, während der Rezeptor auf Trophoblastzellen lokalisiert ist (Saito S et al. 1995). Weitere Studien zeigen eine Assoziation der verminderten Expression des HGF-Rezeptors auf Trophoblastzellen mit Präeklampsie, fetaler Wachstumsretardierung und sogar mit einem möglichen embryonalen Abort (Kauma SW et al. 1999; Trovato M et al. 2002; Nasu et al. 2000; Dokras et al. 2001).

### 2.5.6 *Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )*

Interferone sind Zytokine, die einen wichtigen immunologischen Abwehrmechanismus gegen viraler Infektionen darstellen (Kakumu, S. et al. 1994). Außer antiviraler Eigenschaften (Adolf, 1987) haben Interferone auch immunmodulatorische Funktionen, wie Unterstützung der Aktivität von NK-Zellen, Lymphozyten und Makrophagen (Van den Broek et al. 1995; Boehm et al. 1997; Leonard et al. 1999).

IFN $\gamma$  ist ein Homodimer aus zwei nicht kovalent gebundenen Proteinen von 166 Aminosäuren. Zwei biologisch aktive Formen von 20 kD ohne Glykosylierung und 25 kD mit Glykosylierung sind bekannt. IFN-  $\gamma$  wird hauptsächlich von T-Lymphozyten und NK-Zellen produziert und beeinflusst die Immunantwort durch die Aktivierung von Monozyten, Makrophagen, NK- und T-Zellen und Produktion von weiteren immunmodulatorischen und antiviralen Zytokinen (Steinbach et al. 2002,). Die T-Zell-Differenzierung in Richtung Th1-Zellen und die antiapoptotischen Effekte von B-



Zellen werden auch von IFN-  $\gamma$  beeinflusst (Finkelman et al. 1988; Snapper et al. 1988). Außerdem induziert IFN-  $\gamma$  die Expression der MHC-Moleküle auf den Zelloberflächen und die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen (Chen et al. 1987), was zur Zytotoxizität gegen Tumorzellen führt (Rubin & Gupta, 1980).

Aufgrund seiner Eigenschaften wird IFN-  $\gamma$  auch therapeutisch eingesetzt, wie z.B. bei chronischer Polyarthrit (Lemmel et al. 1991; Freundlich et al. 1992; Machold et al. 1992), bei Dermatiden bei AIDS-Patienten (Reichel et al. 1992; Hanifin et al. 1993), beim septikamischen Schock (Docke et al. 1997). Auch bei Myelomen, malignen Melanomen, Non-Hodgkin-Lymphom und Nierenzellkarzinomen wurde es teilweise mit guten Erfolgen eingesetzt (Krown et al. 1987; Baron et al. 1991; Barth et al. 1995; Bauernhofer et al. 1996).

Es wurde auch die Funktion von IFN-  $\gamma$  in der Schwangerschaft untersucht. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass eine Injektion von IFN-  $\gamma$  zu Störungen der Schwangerschaft führen können, welche dem Spontanabort beim Menschen äquivalent sein könnten (Janeway et al. 1999). Allerdings ist IFN-  $\gamma$  auch in der gesunden menschlichen Plazenta anwesend. Es ist in dem extravillösen Trophoblast sowie in dem Synzytiotrophoblast lokalisiert (Paulesu, Bocci et al. 1991).

Die intrazelluläre Signalübertragung von diesem Zytokin findet hauptsächlich durch die Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 statt (dieser Prozess wird ausführlich im Kapitel 2.6. dargestellt). Es wurde gezeigt, dass die Hemmung dieser Faktoren bei Lymphozyten durch Überstände von Trophoblast- und Tumor-Zellkulturen die potenziell schädliche Wirkung von IFN- $\gamma$  während der Schwangerschaft reduzieren könnte (Poehlmann TG et al. 2005).

## 2.6 Signalkaskaden – intrazelluläre Signalübertragung

Die von Zytokinen und Wachstumsfaktoren gesteuerte Regulation der Zellfunktionen bzw. die Veränderung in der Genexpression findet durch Aktivierung von verschiedenen Signalkaskaden (Signaltransduktionswegen) statt (Pollheimer et al. 2005). Dieser Prozess ermöglicht eine schnelle Übertragung der Zytokinsignale von der Zelloberfläche in den Zellkern und fängt mit der Interaktion zwischen extrazellulären Mediatoren und spezifischen Oberflächenrezeptoren an. Eine entscheidende Rolle für die intrazelluläre Signalübertragung bei trophoblastären und Tumorzellen spielt der JAK/STAT- Signaktransduktionsweg (Janus-Kinase/Signal



Transducer and Activator of Transcription) (Imada et al. 2000; Poehlmann TG et al. 2005).

### *2.6.1 JAK/STAT-Signaltransduktionsweg*

Rezeptoren der JAK/STAT-Signalkaskade gehören zu Transmembranrezeptoren, an deren zytoplasmatischer Domäne eine Tyrosinkinase nicht-kovalent gebunden ist (Alberts et al. 2004). Bei dieser Rezeptorfamilie führt die Ligandenbindung zur Dimerisierung zweier Rezeptoren, wodurch ein Kontakt und eine gegenseitige Phosphorylierung und Aktivierung der Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinasen der JAK-Familie erfolgt. Das ist eine Familie von relativ großen rezeptor-assoziierten Tyrosinkinasen (120-140 kDa), die wegen ihrer „zweiköpfiger“ Struktur nach dem zweigesichtigen römischen Gott Janus benannt sind. In Säugetieren wurden vier Mitglieder dieser Kinase-Familie (Jak1, Jak2, Jak3 und Tyk2) identifiziert (Leonard, W. et al. 1998.). Die aktivierten JAKs phosphorylieren anschließend Tyrosin-Reste in den cytoplasmatischen Domänen der Rezeptoren, was zur Rekrutierung von STAT führt. STAT-Monomere binden über eine SH2-Domäne an den Rezeptor und werden an bestimmten Tyrosinresten phosphoryliert, was zur Aktivierung und Dimerisierung führt. Anschließend werden die phosphorylierten STAT-Dimere in den Zellkern transloziert, wo sie sich an Respons-Elemente binden und so die Genexpression regulieren (Alberts et al. 2004; Löffler et al. 2007).

Die Zahl der bekannten JAKs und STATs ist geringer als die der Rezeptoren und Zytokine. Viele unterschiedliche Zytokine sind in der Lage, durch Aktivierung der JAK/ STAT-Signalkaskade, trotz begrenzter Anzahl an Signalmediatoren ganz gezielt die Expression bestimmter Zielgene zu regulieren. Die Spezifität wird durch die Kombination unterschiedlicher JAK- und STAT-Komponenten gewährleistet. So kann z.B. bei der Ligandenbindung jede Untereinheit der dimeren Rezeptoren unterschiedliche JAKs binden. Dieses führt zur Bildung unterschiedlicher JAK-Dimere. Diese sind in der Lage, nur ganz bestimmte STATs zu aktivieren (Caldenhoven et al. 1996). Die STAT-Monomere sind imstande wiederum Homo- oder Heterodimere mit unterschiedlichen Affinitäten für Promotorsequenzen verschiedener Gene zu bilden, wodurch eine spezifische Bindung mit anschließender Transkriptionskontrolle erreicht wird. Durch Anlagerung zusätzlicher

Regulatorproteine regulieren STATs die spezifische Transkription weiterer Gene (Briscoe et al. 1994).

Neben dem Jak/STAT-Signalweg existieren auch andere Signaltransduktionswege mit anderen Signalmolekülen (z.B. Ras/Raf/MAPK). Ein vollständiges Bild der molekulären Grundlage der Zytokin-Signalübertragung kann nur durch Verständnis der Interaktionen zwischen verschiedenen Signalwegen vergegenwärtigt werden.

### *2.6.2 Die Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) - Familie*

Die Aufklärung der IFN- Signalweiterleitungsmechanismen führte zur Entdeckung der STAT-Familie (Darnell, Jr. et al. 1994; Schindler and Darnell, Jr., 1995; Ihle et al. 1995). Zurzeit sind sieben Mitglieder der STAT-Familie bekannt (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6), die in der Reihenfolge ihrer Entdeckung benannt worden sind (Darnell, J et al. 1997; Leonard, W et al. 1998). Die STAT-Proteine werden von verschiedenen Geweben exprimiert, bestehen aus 750 bis 900 Aminosäuren und stellen sich zunächst als inaktive Monomere im Zytoplasma dar. Sie zeichnen sich durch eine gemeinsame Struktur aus und besitzen strukturell und funktionell konservierte Domänen (Schindler et al. 2007).

Die Src-Homology-(-SH)-2-Domäne vermittelt die Bindung der STAT-Monomere an aktivierte Zytokin-Rezeptoren. Der konservierte Tyrosinrest dient als Substrat für die Phosphorylierung durch Januskinasen. Vermittelt durch die SH2-Domäne und die phosphorylierten Tyrosinreste werden STAT-Homo- und/oder Heterodimere gebildet (Shuai et al. 1994; Hoey et al. 1998; Greenlund et al. 1994). Der Transport der STAT-Dimere in den Zellkern wird durch die N-terminale Domäne und die Coiled-Coil-Domäne gesteuert (Begitt et al. 2000; Schindler et al. 2007). Über ihre DNA-Bindedomäne gemeinsam mit anderen Transkriptionsfaktoren und Coaktivatoren findet die Bindung der Homo- bzw. Heterodimere an ihre Zielsequenzen im Zellkern statt (Hoey et al. 1998). Schließlich erfolgt die Transkriptionsaktivierung der Zielgene bzw. die Synthese unterschiedlicher Proteine mit Hilfe der carboxy (C) – terminalen Domäne der STAT-Proteine (Xu, X. et al. 1996; Kisseleva et al. 2002).

STAT3 dient als Hauptmediator für die Signaltransduktion einer Reihe der schwangerschafts- und tumorrelevanten Zytokine (LIF, IL-6, IFN-g, IL-2, GM-CSF

usw.) (Imada et al. 2000; Tian, Set al. 1994; Zhong et al. 1994) STAT3 liegt in zwei verschiedenen Isoformen vor: STAT3 $\alpha$  (89 kDa) und STAT3 $\beta$  (79 kDa) (Hoey et al. 1998). Wegen der fehlenden C-terminalen Domäne wird STAT3 $\beta$  häufig als dominant negative Form von STAT3 angesehen (Caldenhoven et al. 1996).

Mehrere Studien deuten darauf hin, dass STAT3 von essentieller Bedeutung sowohl für eine erfolgreiche Schwangerschaft als auch für die Tumorgenese ist. In vielen stark invasiven Krebsarten wie Gehirntumoren, Mamma-, Prostata- und Ovarialkarzinomen ist eine übermäßige STAT-Aktivität zu beobachten (Garcia R et al. 2001; Niu G et al. 2002; Schaefer LK et al. 2002; Dhir R et al. 2002). Diese anomale STAT-Aktivierung ist auch mit der Metastasierung von Tumoren assoziiert (Horiguchi A et al. 2002). Darüber hinaus beteiligt sich STAT3 auch an der transkriptionellen Regulation von Proteasen, die für invasives Zellwachstum zuständig sind (Smola-Hess S et al. 2001; Puricelli L et al. 2002; Udayakumar TS et al. 2002). Mittels RNA-Interferenz wurde die entscheidende Rolle von STAT3 bei LIF-induzierter Invasion der Trophoblast- und JEG-3-Chorionkarzinomzellen gezeigt (Poehlmann et al. 2005). Während der Plazentation ist STAT3 sowohl im embryonalen als auch im maternalen Gewebe zu finden. Schon während der Implantation des Embryos hat STAT3 eine unverzichtbare Funktion. Er fördert die Implantation der Blastozyste und reguliert Proliferation, Differenzierung und Invasion der Trophoblasten (Fitzgerald et al. 2007). Studien an STAT3-defizienten Mäusen zeigen, dass STAT3 eine unerlässliche Rolle während der frühen Embryogenese spielt, die von keinem anderen Mitglied der STAT-Familie kompensiert werden kann. Ein „Knock-Out“ von STAT3 bei Mäusen führte immer zur frühen embryonalen Letalität und Abort des Embryo aufgrund schwerwiegender Entwicklungsstörungen am 7,5 Postkoital-Tag, was aber mit einer Substitution von STAT3 gerettet werden konnte (Takeda et al. 1997). Darüber hinaus wurde eine Hemmung der STAT3-Aktivität im Endometrium bei den Mäusen mit gestörten Implantation gezeigt (Catalano RD et al. 2005).

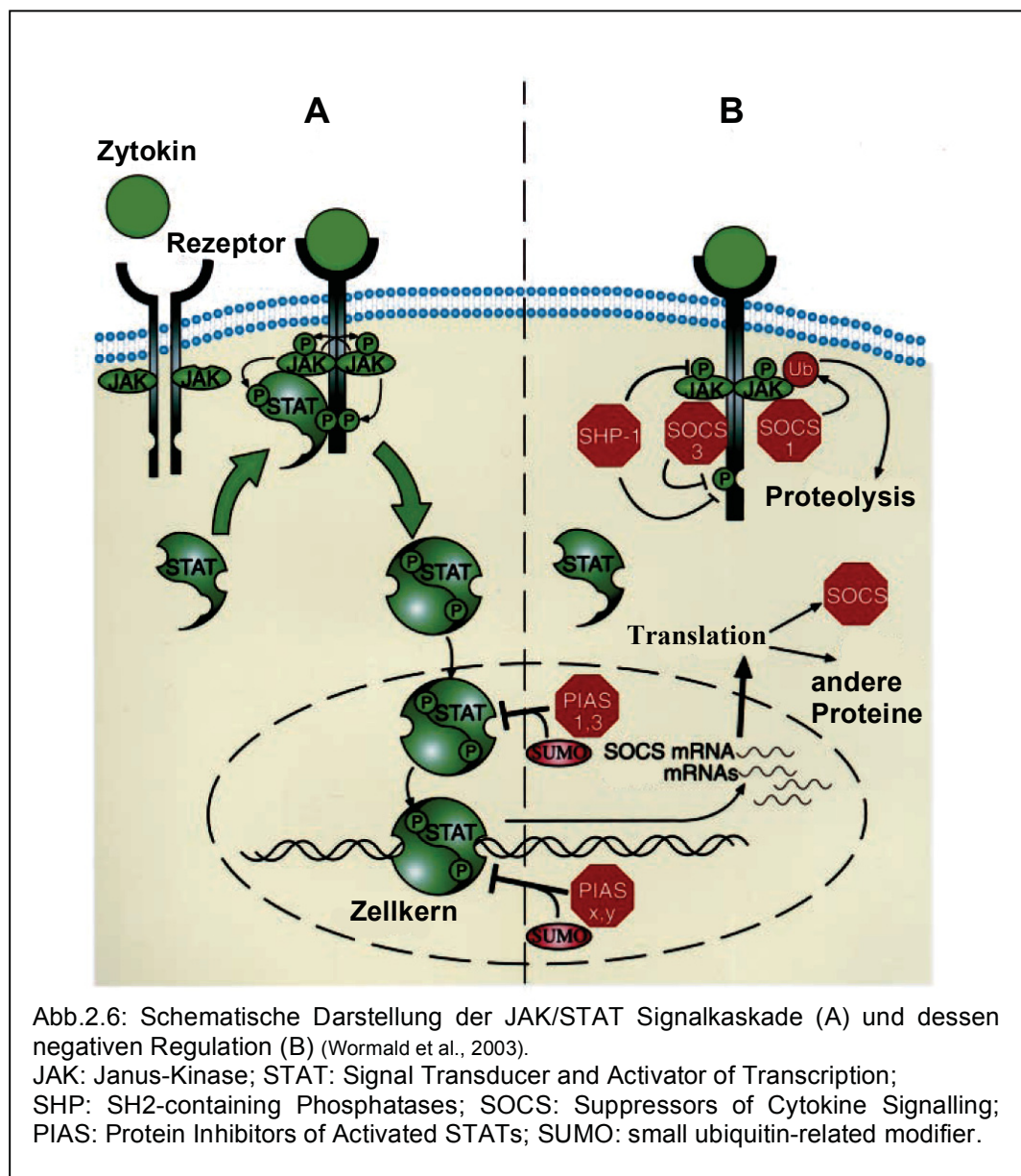
### *2.6.3 Negativregulation des JAK/STAT-Signalwegs*

Übermäßige Zytokinsignale könnten zu katastrophalen biologischen Konsequenzen führen, weshalb die Mechanismen der negativen Signalregulation für adäquate und kontrollierte Zellantworten von entscheidender Bedeutung sind. Um die Entstehung

von Tumoren und Krankheiten zu verhindern, werden die Signalwege an verschiedenen Punkten kontrolliert.

Heutzutage sind mehrere Mechanismen der negativen Regulation des JAK/STAT-Transduktionsweges bekannt (Abb.2.6). Dazu gehören die Internalisierung der Rezeptoren, Dephosphorylierung und Inaktivierung von JAKs, Protein-Protein-Interaktionen, kovalente Modifikationen, Dephosphorylierung der aktiven STAT-Dimere im Nucleus und deren Transport ins Zytoplasma, alternatives Spleißen und proteolytisches Prozessieren (Frank et al 2004; Kisseleva et al. 2002).

Drei Familien von Proteinen, SHP (SH2-containing phosphatases), SOCS (suppressors of cytokine signalling) und PIAS (protein inhibitors of activated STATs) blockieren spezifische und einzelne Aspekte der Zytokinsignaltransduktion über direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen (Samuel Wormald and Douglas J. Hilton, 2003).



### 2.6.3.1. SHP-Familie

Die Mitglieder der SHP-Familie sind an der Regulation der Signaltransduktion von mehreren Cytokinen beteiligt (Abb. 2.6.3). Bei Säugetieren sind zwei Mitglieder der SHP-Familie bekannt. SHP-1 und SHP-2 bestehen aus zwei aufeinanderfolgenden N-terminal-SH2-Domänen und einer C-terminal-PTP (protein-tyrosine phosphatase)-Domäne.

Zytoplasmatische SHP-Proteine werden konstitutiv exprimiert und können die Cytokinsignaltransduktion sowohl durch die Dephosphorylierung der Zwischenprodukte, als auch von JAK und seinem Rezeptor negativ regulieren (Klingmüller U et al. 1995; Yetter A et al. 1995; David, M. et al. 1995).

Beide SHPs binden mit ihren SH2-Domänen die Phosphotyrosin-Reste einer Reihe der Cytokin-Rezeptoren, wie z.B. IFN-, GM-CSF-, IL-4-, c-kit (stem cell factor)-, Erythropoietin- und gp130-Rezeptoren (Kashiwada, M. et al. 2001; Yi, T. et al. 1993; Yi, T. et al. 1995; Symes, A. et al. 1997; Kriti Rakesh et al. 2005).

SHP1 wird hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert, ist aber auch in Epithel- oder glatten Muskelzellen nachzuweisen (Banville D et al. 1995). Im Gegensatz werden die SHP2 ubiquitär exprimiert.

Bei SHP1-defizit - Mäusen konnten wichtige immunologische und hämatopoetische Dysfunktionen und Hyperphosphorylierung von JAK1 und JAK2 beobachtet werden.

Dieses Gen ist häufig in Krebszellen verändert und spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression von Krebs. Eine Störung der SHP-1-Regulation führt zum abnormen Wachstum von Zellen und induziert verschiedene Krebsarten (Herman JG et al. 2003; Jones PA et al. 1999; Chemnitz JM 2004; Tsui HW 2002).

SHP1-Silencing wurde auch bei verschiedenen Arten von Leukämien und Lymphomen (Oka T et al. 2002; Zhang Q et al. 2005), bei dem Myelom (Chim CS et al. 2004) und akuter myeloischer Leukämie (Johan MF et al. 2005) gezeigt.

Eine essentielle Rolle von SHP-1 wurde bei der Untersuchung der von Makrophagen-vermittelten Demyelinisierung bei Multipler Sklerose (MS) nachgewiesen. Die Makrophagen der Patienten mit MS zeigten einen Mangel an SHP-1-Expression, erhöhte Aktivierung von STAT6, STAT1 und einen verstärkten entzündlichen Phänotyp (George P. et al. 2009).

SHP2 kann auch eine stabilisierende Rolle für JAK2 spielen. Eine Hemmung des SHP2-Gens ist für Maus-Embryonen letal oder führt zu den verschiedenen Störungen der Embryogenese [Fischer P, Lehmann U, Sobota RM, Schmitz J,

Niemand C, Linnemann S, et al. The role of the inhibitors of interleukin-6 signal transduction SHP2 and SOCS3 for desensitization of interleukin-6 signalling. *Biochem J* 2004;378:449–60.; Cheng-Kui Qu 2002].

Andere Studien zeigen die klinische Relevanz der von SHP-vermittelter Regulation der Signaltransduktion bei der Pathogenese anderer menschlichen Krankheiten, wie Noonan Syndrom (M. Tartaglia et al. 2001), Neutropenie (Kostmann Syndrom) (N. Tidow et al. 1999), Diabetes (S. Ahmad et al. 1993; J.A. Bonini et al. 1995) und kardiovaskulären Erkrankungen (Massa PT et al. 2004).

#### *2.6.3.2. Feedback-Hemmung durch SOCS –Familie*

Die SOCS-Familie setzt sich aus acht Mitgliedern zusammen: CIS (Cytokine inducible SH2-containing protein) und SOCS1 bis SOCS7. Alle SOCS-Proteine haben eine zentrale SH2-Domäne, welche die Anlagerung des Supressors an phosphorylierte Tyrosinreste vermittelt, eine N-aminoterminal-Domäne mit variabler Länge und Sequenz und eine carboxyterminale konservierte 40 AS lange Domäne, die sogenannte SOCS-Box (Hilton DJ. et al. 1998; K. Boyle et al. 2007).

Im Gegensatz zu den konstitutiv exprimierten Phosphatasen, sind die SOCS durch Cytokin-aktivierbare Gene kodiert. Die Inhibierung der JAK-STAT-Signalkaskade durch SOCS erfolgt über einen klassischen negativen Feedback-Mechanismus. Kurz nach der Stimulation der Zelle mit Cytokinen kommt es zur durch den JAK-STAT-vermittelten Transkription der SOCS-Gene (Abb. 2.6) (Krebs et al. 2001; Greenhalgh et al. 2001).

Die Hemmung der Signaltransduktion durch SOCS kann über unterschiedliche Mechanismen stattfinden. Zum einen binden SOCS-Proteine durch ihre SH2-Domäne direkt an Phosphotyrosinbindestelle des Cytokinrezeptors und verhindern das Rekrutieren und somit die Aktivierung der STATs. Andererseits binden SOCS durch ihre KIR (kinase inhibitory region) - Domäne an das aktive Zentrum der Januskinasen und verhindern die Phosphorylierung inaktiver STAT-Monomere. Über die Wechselwirkung der SOCS-Box mit Elongin B und C, den Proteinen eines E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes, erfolgt der über Proteasomen-vermittelte Abbau von Cytokinrezeptor, JAKs und SOCS (Samuel Wormald et al. 2003; Lyne Valentino et al. 2005; D. J. Hilton et al. 1999; Robyn Starr et al. 1999; Yoshimura et al. 2005).



Die Negative Regulation der Cytokin-aktivierten Signalkaskaden durch SOCS spielt für viele biologische Vorgänge eine essentielle Rolle.

Es konnte nachgewiesen werden, dass eine reduzierte SOCS3-Expression mit der Entstehung von Tumoren, wie z.B. Leberzellkarzinomen (Niwa et al. 2005) und Lungenkrebs (He et al. 2003), assoziiert ist.

Als Regulatoren der Cytokin-Signaltransduktion sind die SOCS-Proteine essentiell für eine normale Immunphysiologie (Pöhlmann et al. 2005). SOCS3 beteiligt sich auch an der Entwicklung und Regulation der Aktivierung von T-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen (Kubo et al. 2003).

Die entscheidende Bedeutung von SOCS in der Schwangerschaft wurde durch eine embryonale Letalität von SOCS3 defizienten Mause gezeigt. Diese wurde von Autoren sowohl auf Defekte des Embryos selbst, als auch auf die abnormale Entwicklung der Plazenta zurückgeführt. (Boyle et al. 2007; Roberts et al. 2001; Marine et al. 1999).

#### *2.6.3.3. Negativregulation durch PIAS-Familie*

##### *PIAS-Familie*

Im Gegensatz zu SOCS werden die Mitglieder der PIAS-Familie konstitutiv exprimiert und dämpfen die Signaltransduktion durch die Blockierung der STAT-Aktivität (Abb. 2.6).

PIAS1 wurde ursprünglich als ein Protein beschrieben, das mit STAT1 interagiert und später als ein spezifischer Inhibitor der STAT1-vermittelten Transkriptionsaktivität charakterisiert (Chung CD. et al. 1997; Liu, B. et al. 1998). Die Mitglieder der PIAS-Familie PIAS3, PIASx und PIASy wurden auf Grundlage der Ähnlichkeit mit PIAS1 identifiziert und blockieren STAT3 (Chung et al 1997), STAT1 (Liu, B. et al. 2001) beziehungsweise STAT4 (Arora, T. et al. 2003). Die Mechanismen, womit die verschiedenen Mitglieder der PIAS-Familie den STAT-vermittelten Signalweg blockieren, sind unterschiedlich. Während PIAS1 und PIAS3 STAT1 beziehungsweise STAT3 binden, und damit deren Bindung mit der DNA blockieren, erfolgt die Inhibierung durch PIASy und PIASx über die Rekrutierung von anderen CoRepressor-Molekülen (z.B. HDACs) (Shuai et al. 2006).

Trotz vorherigen Vorstellungen, dass die Mitglieder der PIAS-Familie nur im Zytoplasma aktiv sind, deuten einige veröffentlichte Arbeiten darauf hin, dass eine intranukleare Aktivität bei manchen Mitgliedern zu beobachten ist. Sie sind an spezifischen Stellen der Kern-Matrix lokalisiert (Tan, JA et al. 2002). In Bezug darauf, ist es von Interesse, dass PIAS-Proteine eine E3-SUMO (small ubiquitin-related modifier)-Ligase-Aktivität zeigen (Johnson, ES et al. 2001; Kotaja, N et al. 2002; Sachdev, S. et al. 2001). Die SUMOylierung ist die Konjugation des SUMO (small ubiquitin like modifier) Proteins mit einem Lysinrest im Substratprotein. Dieser Prozess wird über eine dreistufige enzymatische Kaskade katalysiert. Nach der Übertragung von SUMO auf das aktivierende Enzym (E1) findet die weitere Übertragung von dort auf das konjugierende Enzym (E2) und schlussendlich durch die Ligase (E3) auf den Lysinrest des Zielproteins statt. SUMOylierung spielt eine essentielle Rolle bei der Anlagerung der Transkriptionsfaktoren an die nuklearen Response-Elemente, wobei sie an andere SUMOylierte Proteine, wie z.B. PML (promyelocytic leukaemia) oder Co-Repressor Sp100, binden und damit transkriptionell aktiv oder inaktiv werden (Jackson, PK et al. 2001). PIAS1, PIAS3 und PIASx können alle STAT1 bei Lys-7003 SUMOylieren, eine Stelle, die auch von JAKs (Tyr-701) phosphoryliert werden kann, und damit die STAT1-Aktivierung hemmen (Rogers, RS et al. 2003; Ungureanu, D et al. 2003). Kürzlich wurde nachgewiesen, dass PIASx ein Transkriptions-co-repressor von STAT4 ist und an der Regulation der Chromatinstruktur beteiligt ist (Samuel Wormald et al. 2003).

Obwohl PIAS3 konstitutiv exprimiert wird, erfolgt die Interaktion mit STAT3 nur kurz nach der Stimulation der Zelle mit dem Cytokin. Das deutet darauf hin, dass PIAS3 spezifisch mit phosphoryliertem STAT interagiert. PIAS3 hemmt die STAT-Aktivität durch die Verhinderung der Dimerisierung der aktivierten STAT-Monomere oder möglicherweise durch Vermittlung der Dissoziation der aktiven STAT-Dimere (Robyn Starr et al. 1999). Nach der Stimulation mit dem Cytokin erfolgt die Interaktion von PIAS3 mit STAT3, was die DNA-Bindung von STAT3/STAT3 Homodimeren und STAT1/STAT3 Heterodimeren verhindert (Shuai and Liu, 2005). Dabir et al. haben den zeitlichen Ablauf dieses Prozesses bei der EGF (Epidermal Growth Factor)-Rezeptor-vermittelten STAT3-Signaltransduktion in Lungenkrebs-Zellen untersucht. Außerhalb der Cytokin-Stimulierung zeigte sich eine zytoplasmatische Lokalisierung von PIAS3. Kurz nach der Stimulation mit EGF fanden die Phosphorylierung von STAT3 und die Bindung des STAT3-PIAS3-Komplexes statt. Innerhalb von 5

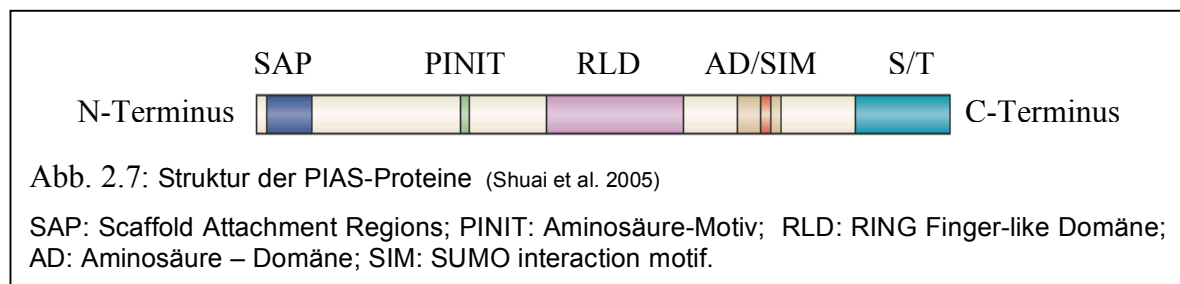


Minuten gab es eine progressive Translokation des Komplexes in den Zellkern und in 10 Minuten hatte PIAS3 eindeutig eine nukleare Lokalisation. Nach 30 Minuten kehrte PIAS3 in das Zytoplasma (Dabir et al. 2009) zurück.

### Struktur der PIAS-Proteine

Die Mitglieder der PIAS-Familie bestehen aus einigen konservierten Domänen und Sequenzmotiven (Abb. 2.7). In einigen Chromatin-bindenden Proteinen ist eine N-terminal gelegene SAP Domäne (*scaffold-attachment factor A + B*; *ACINUS*; *PIAS*) vorhanden. Diese erkennt und bindet AT-reiche DNA, welche insbesondere in den so genannten *Scaffold Attachment Regions* (SAR) zu finden sind.

Wegen der Fähigkeit der SAR DNA-Elemente die Bindung der DNA mit der nuklearen Matrix zu vermitteln, werden sie auch als *Matrix Attachment Regions* (MAR) bezeichnet (Kipp et al. 2000). Es konnte *in vitro* eine Bindung von PIAS1 und PIASy an AT-reiche Oligonukleotide nachgewiesen werden (Sachdev et al. 2001; Okubo et al. 2004).



In der SAP Domäne der PIAS Proteine wurde außerdem ein LXXLL-Aminosäure-Motiv identifiziert. Dieses spielt eine Rolle für die Interaktion von PIAS mit nuklearen Rezeptoren (Gross et al. 2001). Das für die nukleare Retention nötige PINIT-Aminosäure-Motiv wurde in allen PIAS Proteinen nachgewiesen (Shuai and Liu, 2005). Die Mutationen im PINIT-Motiv bei PIAS3 führen zu einem Verlust der exklusiven nuklearen Lokalisation. In dem Fall war PIAS3 nicht mehr nur im Zellkern, sondern auch im Zytoplasma zu finden (Duval et al. 2003).

Im zentralen Bereich der PIAS-Proteine befindet sich eine konservierte *RING Finger-like* Domäne (RLD). Ähnliche Ring-Finger-Domäne ist auch bei Ubiquitin Ligasen vorhanden (Joazeiro and Weissmann, 2000). In Bezug darauf haben PIAS-Proteine eine E3-SUMO-Ligase-Aktivität (Kahyo et al. 2001; Kotaja et al. 2002).

Eine Domäne mit aziden Aminosäuren und die Serin/Threonin-reiche Domäne sind im C-Terminus der PIAS-Proteine. Deren Funktion ist bisher unbekannt. (Shuai and Liu, 2005). Innerhalb der aziden Domäne wurde kürzlich ein SUMO interaction motif (SIM) identifiziert, was die Interaktionen mit dem SUMO-Protein vermittelt (Minty et al. 2000; Hecker et al. 2006).

Die PIAS-Proteine ähneln sich im N-terminalen-, sind aber sehr verschieden im C-terminalen-Bereich.

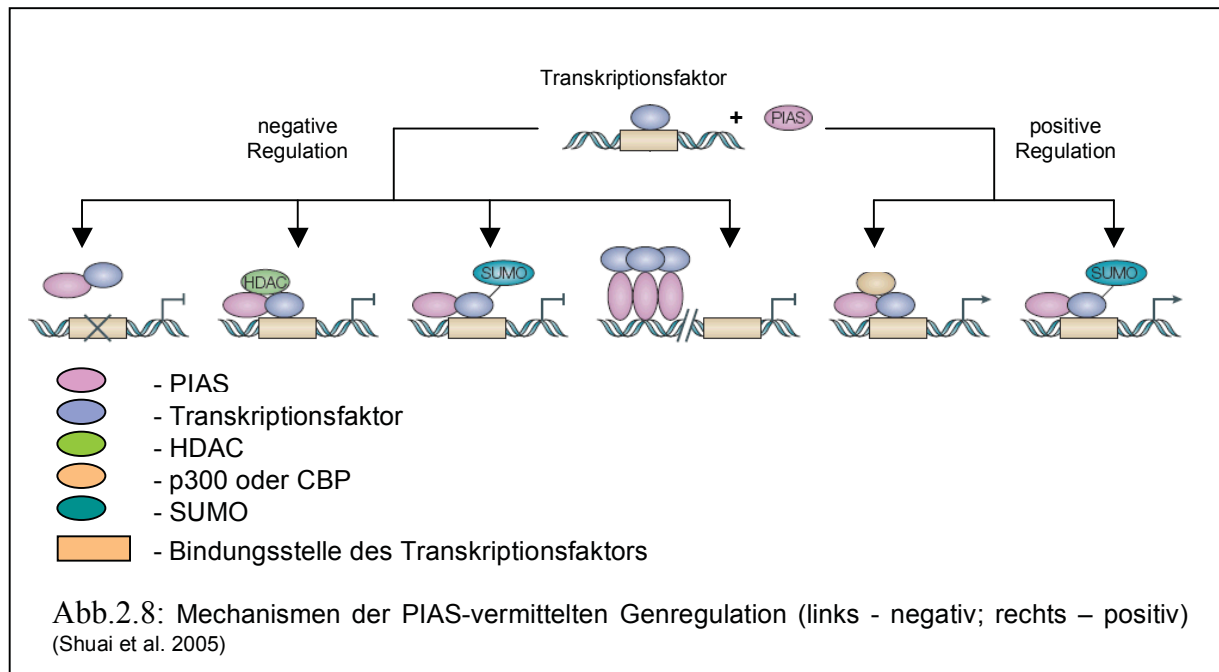
### *Mechanismen der PIAS-vermittelten Genregulation*

PIAS-Proteine können die Transkription sowohl negativ als auch positiv regulieren (Abb. 2.8). Jedoch überwiegen die Beispiele der negativen Regulation. Bisher wurden 4 verschiedene Mechanismen der Genexpression beschrieben:

1. PIAS-Proteine interagieren mit Transkriptionsfaktoren und verhindern dadurch deren DNA-Rekrutierung. PIAS1 blockiert beispielsweise die DNA-Bindung von STAT1 (Liu et al. 2004; Liu et al. 2005).
2. PIAS-Proteine sind in der Lage andere Co-Repressoren zu rekrutieren, um die Transkription zu reprimieren. Nach der Interaktion von PIASy mit HDAC1 und HDAC2 wird zum Beispiel die SMAD3-abhängige Transkription inhibiert (Long et al. 2003; Gross et al. 2004).
3. Die SUMOylierung eines Transkriptionsfaktors kann dessen transkriptionelle Aktivität unterbringen (Sapetschnig et al. 2002; Stielow et al. 2008).
4. PIAS Proteine können die Lokalisation von Transkriptionsfaktoren und Co-Regulatoren durch Interaktion bzw. SUMOylierung beeinflussen (Sachdev et al. 2001).

Interessanterweise zeigen die Mitglieder der PIAS-Familie unter bestimmten Bedingungen auch eine stimulierende Wirkung auf die transkriptionelle Aktivität einiger Transkriptionsfaktoren, wie z.B. des Androgen-Rezeptors (Gross M. et al. 2001; Yamamoto et al. 2003). Es sind zwei mögliche Erklärungen der positiven Regulation der Transkription durch PIAS bekannt. Erstens rekrutieren PIAS-Proteine die transkriptionellen Co-Aktivatoren p300 oder CBP (cyclic-AMP-responsive-element-binding protein (CREB)-binding protein) zur Stimulation der Transkription.

Zweitens fördern PIAS Proteine die SUMOylation des Transkriptionsfaktors und damit seine transkriptionelle Aktivität.



Zusammenfassend kann man sagen, dass PIAS-Proteine über verschiedene molekulare Mechanismen mehrere essenzielle zelluläre Funktionen regulieren.

Die Kenntnisse über den genannten Mechanismus wurden ausschließlich bei Tumorzellen und anderen Zellen, aber nicht in der Schwangerschaft und in der Plazenta gezeigt. Bisher wurde nichts über die regulierende Rolle des PIAS in den Trophoblastzellen publiziert oder herausgefunden. Die schwangerschaftsassozierten Pathologien wie Präeklampsie oder die Bildung eines Chorionkarzinoms könnten auf einer Fehlregulation der PIAS-Proteine beruhen.

Aufgrund der Ähnlichkeit zwischen den Mechanismen der Invasion und der intrazellulären Signaltransduktion in Tumor- und Trophoblastzellen ist die Rolle der verschiedenen PIAS-Isoformen während der Kontrolle der Trophoblasteninvasion sehr interessant und Gegenstand dieser Arbeit.

### Allgemeine Bedeutung der PIAS-Proteine

In vivo Studien an *Drosophila melanogaster* konnten eine wichtige Rolle von PIAS in der Augenentwicklung und Tumorgenese der Fliegen zeigen (Betz et al. 2001; Hari et al. 2001).

Die Rolle der STAT3-Signalkaskade und insbesondere PIAS3 bei der Störung der endothelialen Barrierefunktion in der Pathogenese der mit der Parvovirus B19-assoziierten inflammatorischen Kardiomyopathie wurde von Duechting et al. nachgewiesen (Duechting et al. 2008).

Von der Gruppe von Yaojun Liang wurde die wichtige Rolle der JAK/STAT-Signalkaskade bzw. PIAS3 in der Pathogenese der akuten fokalen segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) gezeigt. Die Autoren sind der Meinung, dass diese Moleküle als diagnostische Marker und molekuläre Behandlungsziele für FSGS dienen können (Liang et al. 2009).

In vitro Untersuchungen von HCV (Hepatitis C Virus)-infizierten Lebern zeigten, dass die HCV-Infektion eine PIAS3-vermittelte Veränderung der STAT3-Aktivität induziert. Die verminderte STAT3-Aktivität korreliert mit der reduzierten Proliferationsfähigkeit der Hepatozyten und kann eine Schwäche des antiviralen Abwehrsystems und eine Störung der antiapoptotischen Balance mit einer fortschreitenden Fibrose verursachen (Stärkel et al. 2006).

Bei anderen in vivo Studien an PIAS1-Knockout-Mäusen war eine erhöhte perinatale Sterblichkeit zu beobachten, und die überlebenden Feten waren stark retardiert (Liu B et al. 2004). Diese Plazenten wurden nicht gründlich untersucht, aber diese Ergebnisse deuteten auf eine Plazentainsuffizienz hin.

Andererseits zeigte sich eine erhöhte Überlebensrate nach der Infektion mit *Listeria monocytogenes*, was auf eine verstärkte Immunantwort hinweist und somit die physiologische Bedeutung der PIAS1-abhängigen STAT1-Zielgene unterstreicht. Für eine verstärkte Immunantwort spricht auch die erhöhte Sterblichkeit der PIAS1-Knockout-Mäuse am endotoxischen Schocksyndrom nach Injektion von LPS (bakterielle Liposaccharide) (Liu et al. 2004; Liu et al. 2005; Tahk et al. 2007).

Die Autoimmun-Mechanismen im Thymus werden von AIRE (autoimmune regulator) reguliert. Die Mutationen von AIRE führen zur Autoimmunerkrankungen. Ilmarinen et al. haben die Bedeutung der Interaktion von AIRE mit PIAS1 bei der Regulation der Genexpression im Thymus gezeigt (Ilmarinen et al. 2007).

Eine Reihe von Studien zeigen die Schlüsselrolle von STAT3 und seinem negativen Regulator PIAS3 für die Hämatopoese und für die Regulation der Immunantwort (Yagil et al. 2010).

### Bedeutung von PIAS in malignen Erkrankungen

Die Forschungsgruppe von Amy Kluge hat die STAT-3-vermittelte onkogene Signaltransduktion von EGF (Epidermal Growth Factor)-Rezeptor bei Lungenkrebs-Zellen (non-small cell lung cancer -NSCLC) untersucht. Die EGFR-Hemmung ist bereits als eine etablierte Behandlungsmethode von NSCLC bekannt. Es wurde gezeigt, dass das in NSCLC exprimierte PIAS3-Protein die STAT3-Aktivität hemmt und damit zur verminderten Proliferation von NSCLC führt. Die Ergebnisse dieser Studie sprachen für einen signifikant erhöhten anti-proliferativen Effekt über die Kombination der EGFR-Blockierung mit der PIAS3-Überexpression (Kluge et al. 2007; Dabir et al. 2009).

Andere immunhistochemische in vitro Studien zeigen eine verminderte Phosphorylierung von STAT3 bzw. ein vermindertes Wachstum und Differentiation in Gehirn-Tumor-Zelllinien (Glioblastoma, Astrocytoma) nach der Stimulierung von STAT3-Inhibitoren (SOCS3 und PIAS3) (Ehrmann et al. 2008; Brantley et al. 2008).

Die von der Behandlung mit Dihydrotestosteron (DHT) ausgelöste PIAS3-Überexpression hemmt die von Androgen-Rezeptor vermittelte Genexpression in Prostatakrebszellen (Junicho et al. 2000).

In vivo Studien an Mäusen zeigen, dass PIAS3 in Maus-Melanoma-Zellen exprimiert wird und ein Schlüsselmolekül für die negative Regulation der STAT3- und MITF (microphthalmia transcription factor) – Signalkaskaden ist. Diese zwei Transkriptionsfaktoren sind für die Entwicklung und das Wachstum der Melanozyten von großer Bedeutung. PIAS3 induziert deren Apoptose durch Inhibierung von STAT3- und MITF-Aktivität. (Levy et al. 2001; Yagil et al. 2009).

PIAS3 ist auch an der negativen Regulation der Estrogen-Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion bei der Onkogenese von Brustkrebs beteiligt (Sentis et al. 2000; Clevenger 2004; McHale et al. 2008).

Die aktuellen Studien zeigen eine erhöhte STAT-Aktivität bzw. eine erniedrigte Aktivität der STAT-Inhibitoren in verschiedenen menschlichen Krebsarten. Es gibt Hinweise, dass die experimentelle pharmakologische oder genetische Modulation ihrer Funktion einen neuen Ansatz in der Strategie der Krebsbehandlung sein kann (Borghouts et al. 2010).

### 3. Ziele der Arbeit

Die Schwangerschaft steht aus vielerlei Gründen im Fokus der Forschung. Dabei gilt es, verschiedene Phänomene zu erklären. Dazu gehört auch die Frage nach der Regulation trophoblastärer Funktionen.

Die Invasion der menschlichen fetalen Trophoblastzellen in das Gebärmuttergewebe während der Plazentation ist im Normalfall ein exakt kontrollierter Prozess (Garbisa et al. 1993; Adams & Antczak, 2001; Poehlmann et al. 2004). Eine Vielzahl von Zytokinen und ihren intrazellulären Signalmolekülen sind an dieser Regulierung der Invasion beteiligt (Heinrich et al., 1998). In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der „Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)-3“ an diesem Prozess beteiligt ist und seine Aktivierung und DNA-Bindung mit der Invasivität von Trophoblastzellen korreliert (Poehlmann et al. 2005; Corvinus et al. 2003; Fitzgerald et al. 2005).

Ziel dieser Arbeit ist, die Rolle von Negativregulatoren des STAT3-Signalweges, insbesondere „Protein Inhibitors of Activated STATs (PIAS)-Moleküle, in der Kontrolle der Invasion von Trophoblastzellen während der Placentation zu analysieren. Es ist von großer Bedeutung, diese Mechanismen in der Plazenta zu verstehen, da diese als ein physiologisches Tumormodell angesehen werden kann. Darüber hinaus sind die molekularen Mechanismen für das Auftreten von Krankheiten wie Präeklampsie oder die Bildung von hydativen Molen, sowie Choriokarzinomen noch weitgehend unklar.

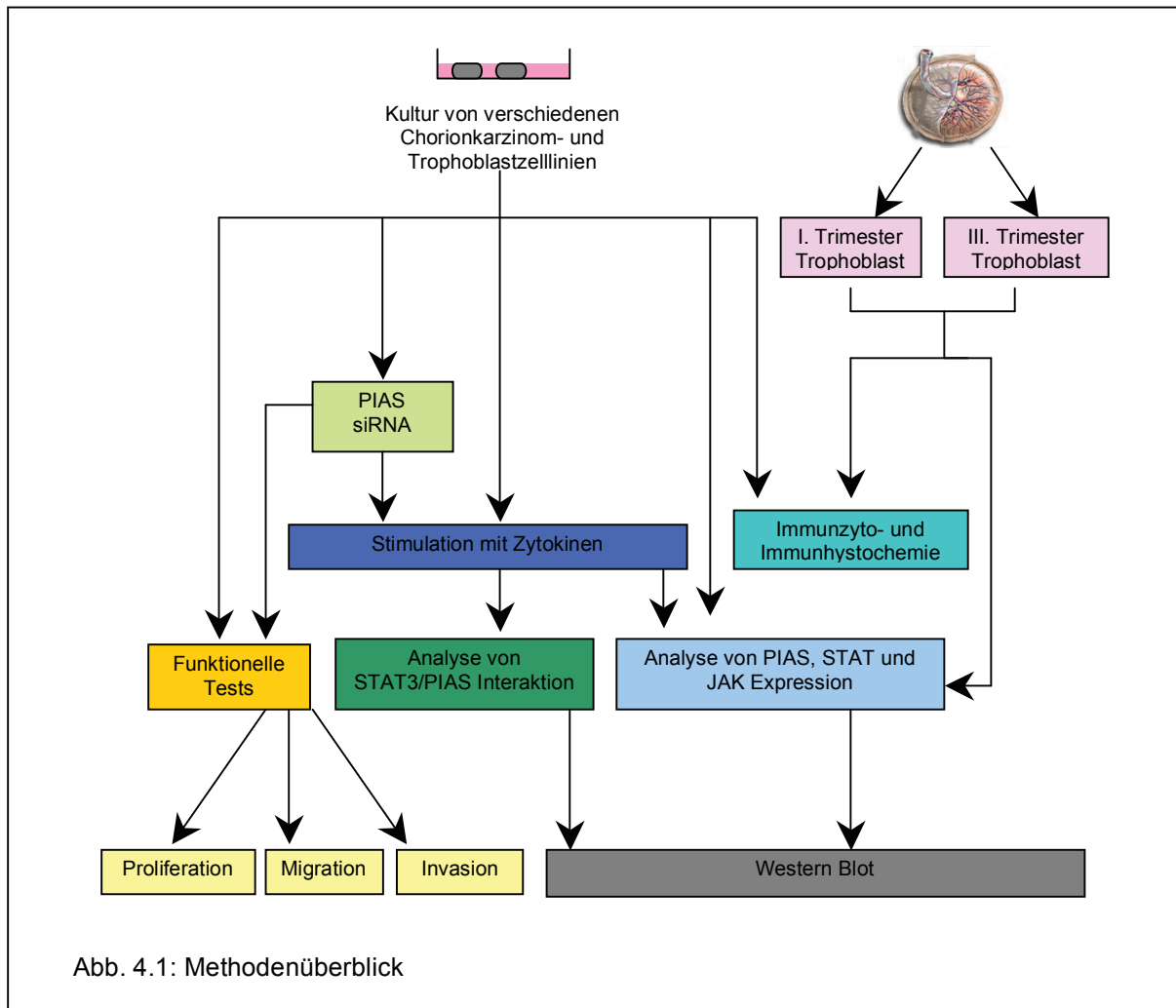
Durch die Benutzung von RNA-Interferenz (Applikation von siRNA) wird die Expression von PIAS-Molekülen in Choriokarzinom- und Trophoblastzelllinien gehemmt. Anschließend soll die Proliferation, Migration und Invasion in diesen Zellen untersucht werden. Gleichzeitig soll validiert werden, ob PIAS-Moleküle mit dem STAT-Signalweg in Trophoblastzellen interagieren. Zum Nachweis der Expression und Phosphorylierung von Signaltransduktionsmolekülen, die potentiell an der Regulation der Invasion von Trophoblastzellen beteiligt sind (Tyrosin- und Serin-Phosphorylierung, sowie Expression von STAT3, STAT1, PIAS1, PIAS3 u.a.), werden Immunzyto- und Immunhistochemie in verschiedenen Zelllinien sowie in Plazentagewebe durchgeführt.

Die dabei abzuklärenden Arbeitshypothesen lauten:

- PIAS Moleküle regulieren den STAT3 Signalweg in Trophoblastzellen
- PIAS Moleküle beeinflussen die Expression anderer Moleküle des JAK/STAT-Signalweges
- PIAS Moleküle sind an der Kontrolle der Proliferation, Migration, Invasion und Fusion von Trophoblastzellen beteiligt.
- Fehlregulation dieser Signalwege könnten eine Rolle bei Komplikationen in der humanen Schwangerschaft spielen und zu einer zu geringen Invasion (z.B. bei Präeklampsie) oder zu einer zu tiefen Invasion (z.B. bei hydativen Molen oder Choriokarzinomen) führen.

## 4. Material und Methoden

Abbildung 4.1 gibt einen Überblick über die, im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit, verwendeten Methoden. Diese werden in den folgenden Abschnitten näher beschrieben.



Alle genutzten Geräte, Materialien und Reagenzien sind unter Abschnitt 4.3 aufgelistet. Die Zusammensetzung von Lösungen, Puffern und Gelen ist dort ebenfalls zu finden.



## 4.1 Biologische Materialien

### 4.1.1 Zelllinien

#### Hintergrund

##### Chorionkarzinom-Zelllinie JAR

Die JAR-Linie wurde von R. A. Pattillo 1971 etabliert. Es handelt sich dabei um Chorionkarzinomzellen, die aus der Plazenta einer 24-jährigen Kaukasierin gewonnen wurden (<http://www.dsmz.de>).

Die JAR-Chorionkarzinom-Zelllinie exprimiert verschiedene, während der Schwangerschaft produzierte Hormone, einschließlich Östrogen, Progesteron,  $\beta$ -HCG und Plazentalaktogen. Die Zellen wachsen adhärent in Einzellschichten, wobei sie auch in der Lage sind, Cluster zu bilden. Die Zellverdopplungszeit beträgt etwa 20 bis 30 h.

##### Chorionkarzinom-Zelllinie JAR (shSOCS3)

In der Arbeit wurde die JAR shSOCS3 (Suppressor of Cytokine Signaling 3) – Zelllinie verwendet, bei der eine anhaltende Supprimierung der SOCS3-Expression mittels shRNA (*short hairpin* RNA) - Transfektion erreicht wurde (Pöhlmann T.G. et al., Placenta-Labor, FSU Jena).

##### Chorionkarzinom-Zelllinie JEG-3

Die Zelllinie JEG-3 ist eine humane, adhärent wachsende Choriokarzinomzelllinie, die von Kohler und Bridson (Kohler and Bridson, 1971) während einer Autopsie aus einer Gehirnmastase eines Chorionkarzinoms isoliert wurde. Zurzeit existieren insgesamt 124 von diesem Ursprungsgewebe ausgehende Subkulturen. Die Zellen haben eine epitheloide Morphologie, wachsen in vitro adhärent als Monolayer und zeichnen sich durch Ausbildung von Zellaggregaten aus. Die Zellverdopplungszeit beträgt etwa 24 h. JEG-3 produziert humanes Choriongonadotropin ( $\beta$ -HCG), humanes Chorion- Somatomammotropin und Progesteron. Ferner können die Zellen aus steroidal Vorstufen Östron und Östradiol synthetisieren (vgl. American Type Culture Collection, Version 4.200201).

### Trophoblast-Zelllinie HTR8/SVneo

HTR8/SVneo-Zellen wurden von Professor Charles H. Graham (Queen's University, Kingston, ON, Canada) gewonnen. Die nichtkanzerogenen HTR8/SVneo-Zellen wurden aus menschlichen extravillösen primären erst-Trimester Trophoblastzellen isoliert, die mit einem Plasmid transfiziert wurden, welches einen „large T“-Antikörper (TAG) vom „simian Virus 40 (SV40)“ enthält. Sowohl die Elternzelllinie (HTR8) als auch die transfizierten (HTR8/SVneo) Zelllinie sind morphologisch ähnlich. Sie sind beide für Cytokeratin positiv, was ihre epithelialen (trophoblastische) Charakter bestätigt. Während die Ursprungszellen nach 12-14 Passagen gealtert sind, kann man die transfizierten Zellen mehr als 32 Passagen in Kultur halten.  $\beta$ -HCG wurde nur bei HTR8/SVneo-Zellen und nicht bei den Ursprungszellen nachgewiesen. Die Proliferationsfähigkeit bei diesen Zellen ist höher als bei ihren nichttransfizierten Ausgangszellen. Die Invasivität von HTR8/SVneo-Zellen in vitro ist mit der von extravillösen primären Trophoblastzellen vergleichbar. Im Gegensatz zu den extravillösen primären Trophoblastzellen lässt sich die Invasivität von HTR8/SVneo-Zellen nicht durch TGF- $\beta$  beeinflussen (TGF- $\beta$  unterdrückt die Invasivität der primären extravillösen Trophoblastzellen). Weder HTR8- noch HTR8/SVneo-Zellen wachsen im Weichagar und bilden keine Tumorstruktur. Verdopplungszeit beträgt etwa 30 bis 40 h (Graham et al. 1993).

### Chorionkarzinom-Trophoblast-Hybrid-Zelllinien AC-1M59 und ACH-3P

Die Hybridzelllinien ACH-3P und AC-1M59 sind ein Ergebnis der Hybridisierung menschlicher Trophoblasten mit der Chorionkarzinomzelllinie JEG-3.

ACH-3P-Zellen entstehen durch eine Fusion von AC1-1-Zellen, einer HGPRT-negativen Mutante der Choriokarzinomzelllinie JEG-3, und Erst-Trimester-Trophoblastzellen aus der menschlichen Eihaut. Die AC-1M59-Zellen sind ein Subklon der ACH-1P-Zellen, die mittels einer somatischen Hybridisierung des humanen Primärtrophoblasten des dritten Trimesters mit AC1-1 generiert wurden (Hiden et al. 2007). Mit Hilfe des DNA-Fingerabdruckes konnte festgestellt werden, daß die Zelllinien sowohl genetisches Material und Eigenschaften der Zelllinie AC1-1 als auch zusätzlich Eigenschaften der extravillösen Trophoblasten, aufweisen. Die Zelllinie AC-1M59 ist nicht malign, während die anderen monoklonalen Zelllinien aus der Hybridpopulation ACH1P schwach (AC1-1, AC-1M32 und AC-1M46) oder stark

(AC-1M81 und AC-1M88) malign sind. Die Proliferationsfähigkeit der ACH-3P-Zellen wurde als stark beschrieben, während ihre Invasionsressourcen (Invasionstiefe und Invasionsdauer) mit denen der Primärtrophoblastzellen des ersten Trimesters vergleichbar sind. Die Zellen haben eine epitheloide Morphologie und wachsen adhärent in Einzell-Schichten. Ihre Verdopplungszeit beträgt etwa 50 h.

### Kultur der Zelllinien

Die Zelllinien JAR, JEG-3, JAR SOCS3-shRNA, AC-1M59 und ACH-3P werden in 50ml-Zellkultur-Flaschen mit DMEM, welches 10 % FKS (fetales Kälberserum) und 2 % P/S (Penicillin/Streptomycin) enthält, bei Standardbedingungen (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, humide Atmosphäre) in Kultur gehalten. Entsprechend der Wachstumsgeschwindigkeit werden die Zellen alle 2-3 Tage steril abtrypsiniert und verdünnt. Dazu wird aus den Zellkulturflaschen das Medium abgenommen, die Zellen mit 5ml PBS gewaschen. Anschließend inkubiert man mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 5-10 min bei Standardbedingungen. Während dieser Zeit lösen sich die Zellen von der Kulturflasche. Danach werden die Zellen etwa im Verhältnis 1:5 mit neuem Medium verdünnt und bei oben genannten Bedingungen weiter kultiviert. Der Rest wird für Experimente verwendet oder verworfen.

Die Kultivierung HTR8/SVneo Zellen verläuft analog zu den oben beschriebenen Zelllinien. Statt DMEM wird RPMI 1640 Medium mit 5% FKS verwendet.

### Einfrieren und Auftauen der Zelllinien

Die Zellen werden zum Einfrieren, wie oben beschrieben, in Einzelzellsuspensionen überführt (abtrypsiniert) und bei 300g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wird in Einfriermedium (95% DMEM-Medium I, 5% Dimethylsulfoxid (DMSO)) resuspendiert. Die Zellsuspension wird auf Eppendorfgefäße verteilt und diese anschließend bei -80°C gelagert.

Zum Auftauen für die Überführung in Kultur werden gefrorene Zellen in einem Wasserbad zügig aufgetaut und in 5ml Medium aufgenommen. Nach anschließender Zentrifugation (300g, 5 Minuten) wird der Überstand verworfen und die Zellen in DMEM-Medium I resuspendiert und in 50 ml-Zellkultur-Flaschen ausgesät.

#### 4.1.2 Die Isolierung der primären Trophoblastzellen

Die Plazentagewebe werden von gesunden Müttern nach unauffälligem Schwangerschaftsverlauf aus der Frauenklinik der Friedrich-Schiller-Universität Jena erhalten. Die Trophoblastzellen werden aus dem villösen Gewebe reifer (37. – 41. SSW) und unreifer (6. – 12. SSW) Plazenten nach einer modifizierten Methode von Kliman (Kliman, Nestler et al. 1986) isoliert.

Für die Isolierung von Trophoblastzellen werden ca. 30g Gewebe der Decidua von der maternalen Seite der Plazenta in eine Petrischale überführt und mit 10 ml HBSS überschichtet. Mittels Schere und Skalpell wird das Gewebe unter sterilen Bedingungen mechanisch disaggregiert und zerkleinert, um größere Kapillaren und Bindegewebsmembranen zu entfernen. Anschliessend werden die Gewebstücke in eine Gewebekulturflasche überführt und mit Verdauungspuffer 1 Stunde im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Danach wird die Zellsuspension abgenommen und bei 400g für 10min zentrifugiert. Neuer Verdauungspuffer wird in die Gewebekulturflasche gegeben und für weitere 30 min inkubiert. Dieser Schritt wird noch zweimal wiederholt. Während der Verdauungsschritte wird in 15 ml Reaktionsgefäßen ein Percoll-Stufen-Gradient, bestehend aus je 1ml eines 10%-60%-igem Percolls, vorbereitet. Anschliessend wird das Pellet in 4 ml 1X-HBSS mit 1 % AAS und 10 % FKS aufgenommen, auf den Percoll-Gradient geschichtet und bei 700f für 20 min ohne Bremsvorgang zentrifugiert. Danach werden die Schichten (Abb. 4.2.), die zwischen 30 – 45 % Percollschicht sich befinden und in denen die Trophoblasten enthalten (Abb.ooo), abgenommen und in einer 15 ml Tube pipettiert. Die Zellsuspension wird dreimal (jeweils 10 min, 300g) mit 10 ml DMEM + 5 % FKS gewaschen.

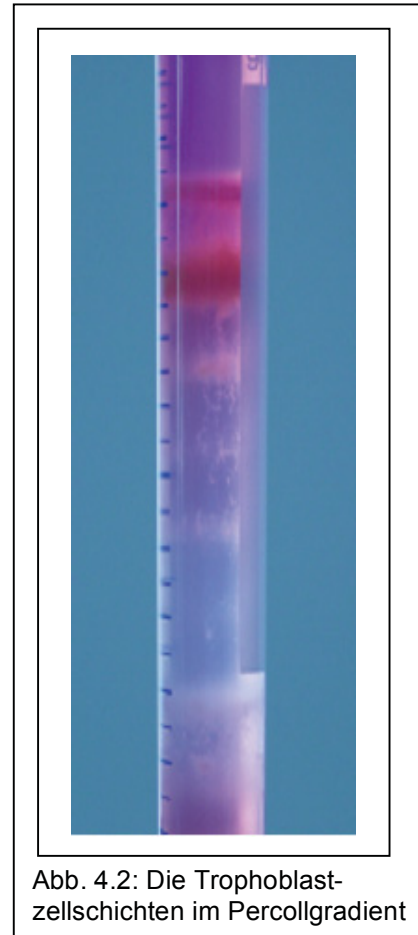


Abb. 4.2: Die Trophoblastzellschichten im Percollgradient

Für die Reinigung der Trophoblasten mittels Dynabeads wird die Zellsuspension mit anti CD3, CD9, CD14, CD31 und CD45-Antikörpern (Maus, Firma DAKO) für 1

Stunde bei Raumtemperatur im Dunkel inkubiert. Es folgt die Zugabe von Anti-Maus IgG-Antikörpern (Ziege, Firma Dynal). Durch diese Eisenpartikel-beladenen Antikörper werden die Lymphozyten und Monozyten depletiert. Anschließend werden die Zytotrophoblastzellen unter Standardbedingungen in DMEM-Medium (10% FKS, 2% AAS) kultiviert.

#### *4.1.3 Isolierung von Lymphozyten*

Die Isolierung der Lymphozyten des peripheren Blutes erfolgt nach dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation. Dazu wird eigenes venöses Blut in Li-Heparin-Röhrchen abgenommen und sofort weiterverarbeitet.

Nach der Verdünnung mit PBS im Verhältnis 1:1 wird das Blut in einem 15 ml Teströhrchen vorsichtig auf 3 ml Ficoll (Lymphocytenseparationsmedium, PAA Laboratories) aufgeschichtet und 20 Minuten lang bei 700g zentrifugiert (Lympho-Bande wird als weißlicher Streifen auf dem Ficoll sichtbar). Nach dem Herauspipettieren werden die Lymphozyten dreimal mit jeweils 5 ml RMPI für 5 Minuten bei 300g gewaschen. Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden weiter für die Isolierung von Proteinen verwendet.

### 4.2 Methoden

#### *4.2.1 Bestimmung der Lebend-Zellzahl mit Trypan-Blau*

Zur Bestimmung der Zellanzahl pro Milliliter Medium wird einem Aliquot der Zellsuspension mit abtrysinierten Zellen Trypan-Blau im Verhältnis 1:3 zugegeben. Vitale Zellen erscheinen unter dem Mikroskop farblos, während tote Zellen blau angefärbt werden. Nach 1 min wird eine Neubauer-Zahlkammer mit der angefärbten Suspension vollständig befüllt. Dann lässt sich die Anzahl der lebenden Zellen unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors unter dem Mikroskop auszählen und auf das gesamte Zell-Medium hochrechnen.

### 4.2.2 RNA-Interferenz

#### Hintergrund

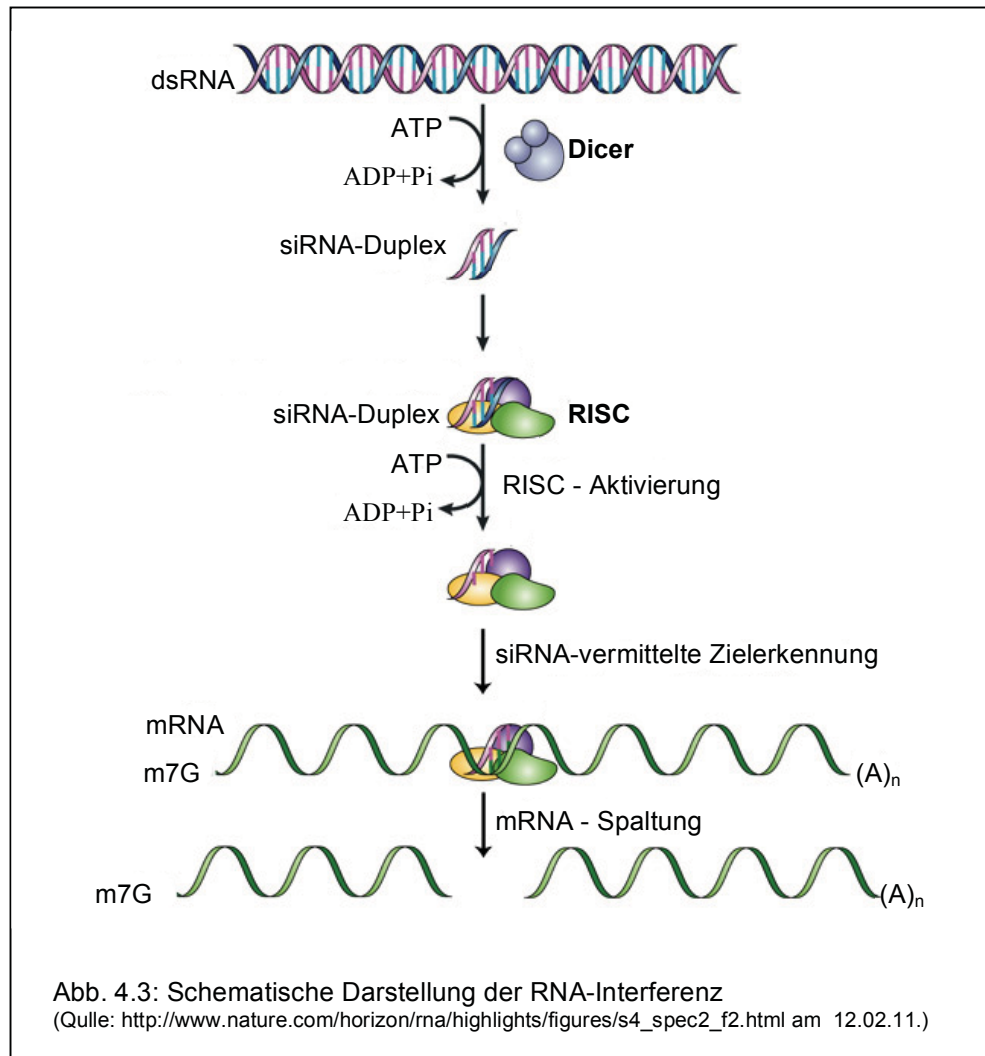
RNA-Interferenz (RNAi) ist ein evolutionär konservierter Mechanismus der sequenz-spezifischen post-transkriptionalen Genregulation in eukaryotischen Zellen, der über small interfering RNAs (siRNAs) vermittelt wird (Elbashir et al. 2001; Hammond, S et al. 2000).

RNAi führt zur Spaltung, zur Translationsblockade der Ziel-mRNA oder zum Methylieren und Abschalten des entsprechenden Gens. Somit wird die Produktion spezifischer Proteine reduziert. Darüber hinaus findet dieser Mechanismus in der modernen Molekularbiologie Anwendung und dient, sowohl in vitro als auch in vivo, der funktionellen Genanalyse. Seit der Entdeckung der RNA-Interferenz nutzt man diesen Mechanismus, um die Expression von spezifischen Genen gezielt zu hemmen.

Man unterscheidet in experimenteller Hinsicht zwischen siRNA (small interfering RNA) und shRNA (short hairpin RNA). Bei siRNAs handelt es sich um kleine doppelsträngige RNA-Oligonukleotide, die meist aus einer 19 Nukleotide langen Doppelstrangregion mit Einzelstrangüberhängen von je zwei Nukleotiden bestehen.

Nachdem sie in die Zelle eingebracht wurden, aktivieren sie einen RNA-induced silencing complex (RISC). Der RISC ist ein Multiproteinkomplex mit vier verschiedenen funktionellen Untereinheiten: einer Helicase, einer Exonuklease, einer Endonuklease und Homologie-suchenden Domänen (Lee, S et al. 2006) (Abb. 4.3).

Mit Hilfe einer ATP-abhängigen Helicase wird das an den RISC gebundene siRNA-Duplex entwunden und es entstehen dadurch zwei Einzelstränge (Nykanen et al. 2001). Einer der beiden Einzelstränge führt den RISC zu der komplementären Ziel-mRNA (Martinez et al. 2002). Nach der Bindung des siRNA-RISC-Komplexes wird die mRNA gespalten. Durch die Aktivität der Endonuklease und der Exonuklease erfolgt der Schnitt in der Mitte des siRNA-mRNA-Duplexes. Die zerschnittene mRNA ist sehr instabil und wird rasch von RNasen abgebaut, was die Translation und somit die Neuproduktion eines Proteins verhindert. Diese auf siRNA beruhenden „Knockdown“-Effekte dauern aber in Abhängigkeit der Proliferationsfähigkeit sich teilender Zellen nur drei bis sieben Tage an (Omi 2004).



Auf Grund ihrer Fähigkeit die Expression von Genen sequenz-spezifisch unterdrücken zu können, sind siRNAs geeignete Werkzeuge für funktionelle Analysen von Genen und Proteinen. Es gibt verschiedene Methoden um mit Hilfe von RNAi die Genexpression zu hemmen. In dieser Arbeit wurden hierzu chemisch synthetisierte siRNA für PIAS1 und PIAS3 mittels verschiedenen Transfektionsreagenzien direkt in die Zelllinie eingeschleust. Anschließend wurden die transfizierten Zellen für funktionelle Analysen verwendet.

## „Knockdown“ durch siRNA

### Annealing der Oligonukleotide

Die aus Einzelsträngen bestehenden Sense- und Antisense-Oligonukleotide werden in der Konzentration 100 µM in nuklease-freiem Wasser gelöst. Anschließend erfolgt die Bildung der siRNA-Duplicis. Dazu werden der zuvor gelösten gleiche Mengen dieser Sense- und Antisense-Oligonukleotide (jeweils 20 µl) in 5x „Annealing Buffer“ mit einer Endkonzentration von 10 µM für 5 Minuten bei 90 °C und anschließend für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die so entstandene doppelsträngige siRNA kann bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

### Transfektion von Zielzellen

JAR Zellen werden mit siRNAs transfiziert, um die Expression von PIAS1 und PIAS3 zu hemmen. Es werden unterschiedliche Transfektionsmethoden, d.h. verschiedene Transfektionsreagenzien und Elektroporation, getestet. Als Kontrolle dienen Zellen, die mit der „scrambled“ (SCR) STAT3-siRNA transfiziert werden. Die SCR STAT3-siRNA besitzt die gleiche Länge und Nukleotidzusammensetzung wie die STAT3-siRNA. Da die Nukleotide aber in einer zufälligen („scrambled“) Reihenfolge angeordnet sind, gibt es für diese siRNA keine Zielsequenz im Transkriptom der Zelle und sie kann als Negativkontrolle für die Spezifität von siRNA-Effekten dienen. Die SCR STAT3-siRNA wird als nicht-genomische Kontrolle für alle siRNA-Transfektionen verwendet. Der Einsatz der fluoreszenz-markierten SOCS3-Cy3 siRNA ermöglicht die Bestimmung der Transfektionseffizienzen mittels Durchflusscytometer. Am Vortag der Transfektion mit siRNA werden die zu transfizierenden Zellen abtrypsiniert und gleichmäßig unter Zugabe von DMEM-Medium I auf eine 6-Well-Platte aufgeteilt.

### Transfektion mit Oligofectamine<sup>TM</sup>

Unter sterilen Bedingungen präpariert man den Transfektionsansatz. Dazu werden 10 µl der 10 µM siRNA mit 175 µl serumfreiem Optimem-Mangelmedium gemischt. In einem zweiten Ansatz mixt man 4 µl Oligofectamine<sup>TM</sup>-Reagenz mit 11 µl Optimem. Anschließend werden die Inhalte beider Ansätze zusammengeführt, gemischt und 20



min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wird das Medium von den adhären Zellen entfernt und durch 800 µl serumfreies Optimum ersetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die 200 µl Transfektionsansatz, welche siRNA in einer Endkonzentration von 100 nM enthalten, vorsichtig und langsam zu den Zellen pipettiert und bei Standardbedingungen inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden wird die Transfektion gestoppt, indem 500 µl DMEM-Medium (mit 30% FKS, ohne AAS) zugegeben wird. Die Zellen werden anschließend bei oben genannten Bedingungen weiter kultiviert. Bei jeder Transfektion wird eine untransfizierte Negativkontrolle sowie eine Kontrolltransfektion mitgeführt, in welcher dieselben Nukleotide in einer nicht-genomischen Reihenfolge angeordnet sind.

Nach 24 bis 48 h wird der Erfolg der Transfektion durch Protein-Nachweis mittels Elektrophorese und Western-blot oder durch funktionelle Tests kontrolliert.

#### Transfektion mit HiPerFect™

In diesem Fall wird für die Transfektion ein Transfektionsansatz präpariert, der aus 100 µl serumfreiem Optimum, 3 µl HiPerFect™-Reagenz und 10 µl der 10 µM siRNA besteht. Dieser Ansatz wird 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit ersetzt man das Medium auf den zu transfizierenden Zellen durch 900 µl serumfreies Optimum. Danach wird der Transfektionsansatz vorsichtig zu den Zellen pipettiert. Alle beschriebenen Schritte werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden 24 bis 48 h, bei Standardbedingungen kultiviert. Anschließend wird der Transfektionserfolg überprüft.

#### Transfektion mit Nanofectin™

Als weiteres Transfektionsreagenz wird Nanofectin™ getestet. Für die Transfektion werden 2 Transfektionsansätze vorbereitet. 10 µl der 10 µM siRNA werden mit 60 µl (entspricht Ansatz 1) und 6 µl Nanofectin mit 60 µl serumfreiem Medium gemischt (entspricht Ansatz 2). Diese beiden Ansätze werden dann sehr vorsichtig zusammenpipettiert und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend vorsichtig und langsam den Zellen zugegeben. Die Transfektionsreaktion wird nach 4 h mit DMEM- Medium, welches 30% FKS enthielt aber kein Antibiotikum, abgestoppt.

Die folgenden Transfektionsreagenzien wurden auch für die siRNA-Transfektion getestet: FuGENE HD, ICAfectin™ und Gene Silencer. Die Behandlung der Proben richtete sich jeweils nach den Herstellerangaben.

#### *4.2.3 Proteinnachweis*

Der Protein-Nachweis wird sowohl für die Erfolgskontrolle eines Protein-„Knockdowns“, als auch für Expressionsstudien, beispielsweise nach Zytokinstimulierung, herangezogen.

#### *Lysieren der Zellen, Isolierung von Proteinen*

Zuerst wird das Kulturmedium abpipetiert und die Zellen werden mit 500 µl PBS gewaschen. Danach gibt man 100 µl Lysepuffer, ebenfalls versetzt mit Proteinaseinhibitor, auf die Zellen und nimmt die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Vertiefung ab. Um die Zellmembranen vollkommen aufzuschließen, werden die Zellen durch dreimalig abwechselndes Gefrieren in flüssigem Stickstoff, auftauen und durchmischen mittels Vortexer lysiert. Dann zentrifugiert man 20 min bei 30000g und 4 °C. Anschließend wird der proteinhaltige Überstand abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### *Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay*

Mit dieser Methode kann eine quantitative Bestimmung der Proteinmenge in einer Probe durchgeführt werden (Bradford, 1976). Prinzip dieser Methode ist die Reduktion von Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>1+</sup> durch Proteine in einer alkalischen Lösung (Biuret Reaktion). Die Proteine binden das Farbreagenz und das Extinktionsmaximum steigt von 465 auf 595 nm. Dadurch kann eine Absorptionsmessung bei 595 nm zur Konzentrationsbestimmung der Proteine herangezogen werden (Lottspeich, 1998). Zunächst werden 5 µl der Probe mit 995 µl Bradford-Reagenz gemischt und 10 min unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird eine Absorptionsmessung bei 595 nm durchgeführt. Parallel zu den Zelllysaten werden Proben mit bekannten Konzentrationen von BSA gemessen. Aus den

Absorptionswerten dieser Standards wird in Abhängigkeit ihrer Konzentration eine Standardkurve erstellt, die zur Ermittlung der Proteinkonzentration der Lysate dient.

### Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die gebräuchlichste Methode Proteingemische aufzutrennen, ist die SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE), bei der die Proteine aufgrund ihrer Molekularmasse aufgetrennt werden. Die Proteine werden im Vorfeld der Elektrophorese durch  $\beta$ -Mercaptoethanol und SDS denaturiert, wodurch sie stäbchenförmige Gestalt annehmen und in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts negative Ladungen erhalten. Das Ladungs-Größen-Verhältnis ist danach für alle aufzutrennenden Proteine praktisch gleich. Deswegen wird ihre anschließende Wanderung im Elektrophorese-Gel in Richtung Anode des elektrischen Felds nun hauptsächlich vom Molekulargewicht und der angelegten Spannung bestimmt. Bei der Elektrophorese wandern Proteine mit kleinem Molekulargewicht schneller als solche mit großem Molekulargewicht, was zur Auftrennung der Proteine im Gel führt (Abb.4.4.) (Voet 2002, Wink 2004).

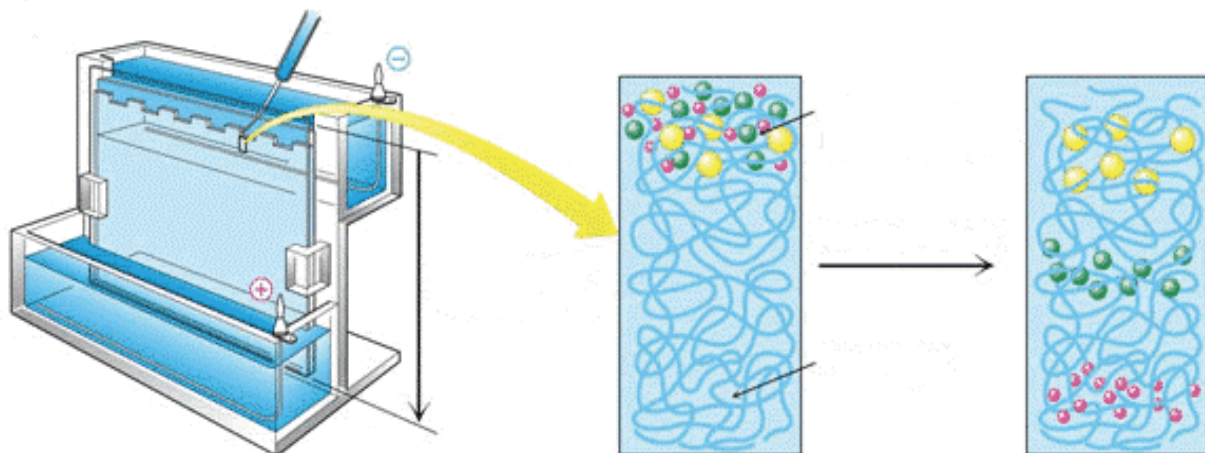


Abb 4.4. Schematische Darstellung der SDS-Polyacrylamid-Gel-elektrophorese  
(Quelle: [http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics\\_WEB/proteins\\_purification.html](http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/proteins_purification.html) am 12.02.11.)

### Durchführung

Zunächst werden die Gele für die Elektrophorese hergestellt (s. Abschnitt 4.3.3). 12%ige Trenngele wurden für kleinere Proteine (20-50 kDa) und 7,5%ige Trenngele für größere Proteine (35-100 kDa) verwendet. Die Proben werden mit Auftragspuffer versetzt und zusammen mit dem Molekulargewichtsmarker für 5 Minuten bei 95 °C zur Denaturierung der Proteine inkubiert. Danach werden sie in die Probentaschen des auspolymerisierten Gels gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei 25 mA in 1 x Running Buffer. Anschließend werden die Gele für den Western Blot weiter verwendet.

### Western Blot

Unter dem Begriff „blotten“ versteht man die Übertragung bestimmter Substanzen auf eine Membran. Dort können sie dann detektiert und quantifiziert werden. Wenn es sich bei diesen Substanzen um Proteine handelt, spricht man von einem Western-blot (Immunblot). Der Western-blot ermöglicht eine Identifizierung und/oder Quantifizierung spezifischer Proteine innerhalb eines Proteingemisches. Die Detektion erfolgt gewöhnlich mittels Antikörper, die spezifisch an antigene Epitopie des auf der Membran fixierten Zielproteins binden.

### Durchführung

Zunächst werden die Proteine durch Elektroblothing auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und dort immobilisiert. Filterpapier, Nitrocellulose-Membran und Gel werden dazu mit Transferpuffer getränkt, übereinander geschichtet und für den Transfer eine Stromstärke von 240 mA/Membran für 10-25 min an die Blotapparatur angelegt. Die Proteine werden, abhängig von ihrer Größe, auf die Membran transferiert.

Anschließend erfolgt die Färbung der Membran mit Ponceau-S-Lösung um das Ergebnis des Blottens zu überprüfen und eine Entfärbung mit 0,8 %iger NaOH-Lösung. Anschließend wird die Membran für 15 min in einer Blocker-Lösung inkubiert.

Stattdessen kann auch eine 5%ige Milchpulverlösung verwendet werden. Dieser Schritt ist notwendig, um alle möglicherweise vorhandenen unspezifischen Bindungsstellen abzusättigen

Für die Detektion wird die Membran mit dem entsprechend verdünnten Primärantikörper, welcher spezifisch das nachzuweisende Protein bindet, in 1 x NET-G-Puffer über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wird die Membran erneut dreimal für je 5 min mit NetG-Puffer gewaschen und mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper, der spezifisch an den zuvor verwendeten Primärantikörper bindet, in 1 x NET-G-Puffer für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem 3-maligem Waschen mit NetG wird etwa 1 ml HRP-Substrat-Lösung auf die Membran gegeben. Danach legt man einen lichtempfindlichen Film auf und inkubiert etwa 30 min im Dunkeln. Anschließend wird der Film mit Hilfe von Entwickler- und Fixierlösung behandelt und getrocknet. Unter Verwendung des Gel-Dokumentationssystems MF-Chem BIS 3.2 und der zugehörigen Gel-Capture-Software werden die Filme in einen PC eingelesen und die Intensität der jeweiligen Signale mittels Totallab TL100 V2006b-Software bestimmt.

#### *4.2.4 Funktionelle Tests*

Um den Einfluss des Knockdowns von PIAS- Isoformen auf zelluläre Funktionen zu untersuchen, werden folgende funktionelle Tests im Vergleich mit Kontrollen durchgeführt. Dazu bleiben die Zellen entweder unstimuliert oder werden mit bestimmten Zytokinen inkubiert.

##### Zellstimulierung

Um den Einfluss verschiedener Zytokine auf zelluläre Funktionen zu untersuchen, werden die Zytokine dem Zellkultivierungs-Medium zugegeben. Je nach verwendetem Stimulationsprotokoll können nach 24 oder 48 h funktionelle Tests durchgeführt werden.

### Proliferationsassay

Um die Proliferation der Zellen in einem bestimmten Zeitraum zu untersuchen, werden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit Hilfe von Trucount™ Tubes gezählt. Dafür werden die Zellen am Folgetag nach Transfektion abtrypsiniert, mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und je 30.000 Zellen in 700 µl DMEM suspendiert. Danach werden diese in die Vertiefungen einer 24-well-Platte gesät (mit oder ohne Zytokinstimulation). Nach der Inkubationszeit von 24 h bei Standardbedingungen werden die Zellen abtrypsiniert, in ein Probenröhrchen überführt und mit Hilfe eines Durchflusszytometers gezählt.

### Migrationsassay

Zellen, deren Migrationssverhalten untersucht werden soll, werden zunächst abtrypsiniert, mit in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und in 700 µl DMEM suspendiert. Danach werden diese (mit oder ohne Zytokinstimulation) in Inserts gesät, welche wiederum in die Vertiefungen einer 24-well-Platte eingebracht werden. Der Boden der verwendeten Inserts enthält Poren definierter Größe, wodurch die Zellen in die Vertiefungen der well-Platte wandern (Abb 4.5). Nach einer 24-stündigen Inkubationszeit bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> entfernt man die Inserts. Anschließend werden die Zellen, die sich innerhalb der 24-well-Platte befinden, also durch den Boden der Inserts migriert sind, abtrypsiniert, in Probenröhrchen überführt und mittels Durchflusszytometrie gezählt.

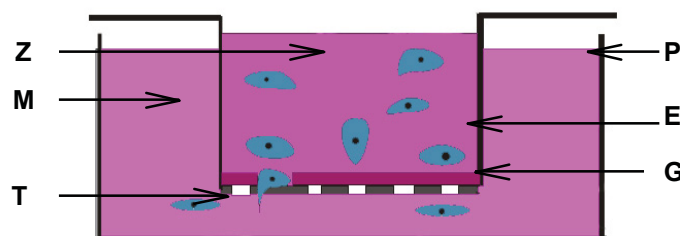


Abbildung 4.5: Schematische Darstellung eines Assayeinsatzes. P: 24-Loch- Platte. E: Einsatz mit Filter. M: Zellkulturmedium. Z: Zellsuspension im Einsatz. T: Transwellfilter (hier unbeschichtet, im Invasionsassay (s.u.) mit Matrigel (G) beschichtet).

### Invasionsassay

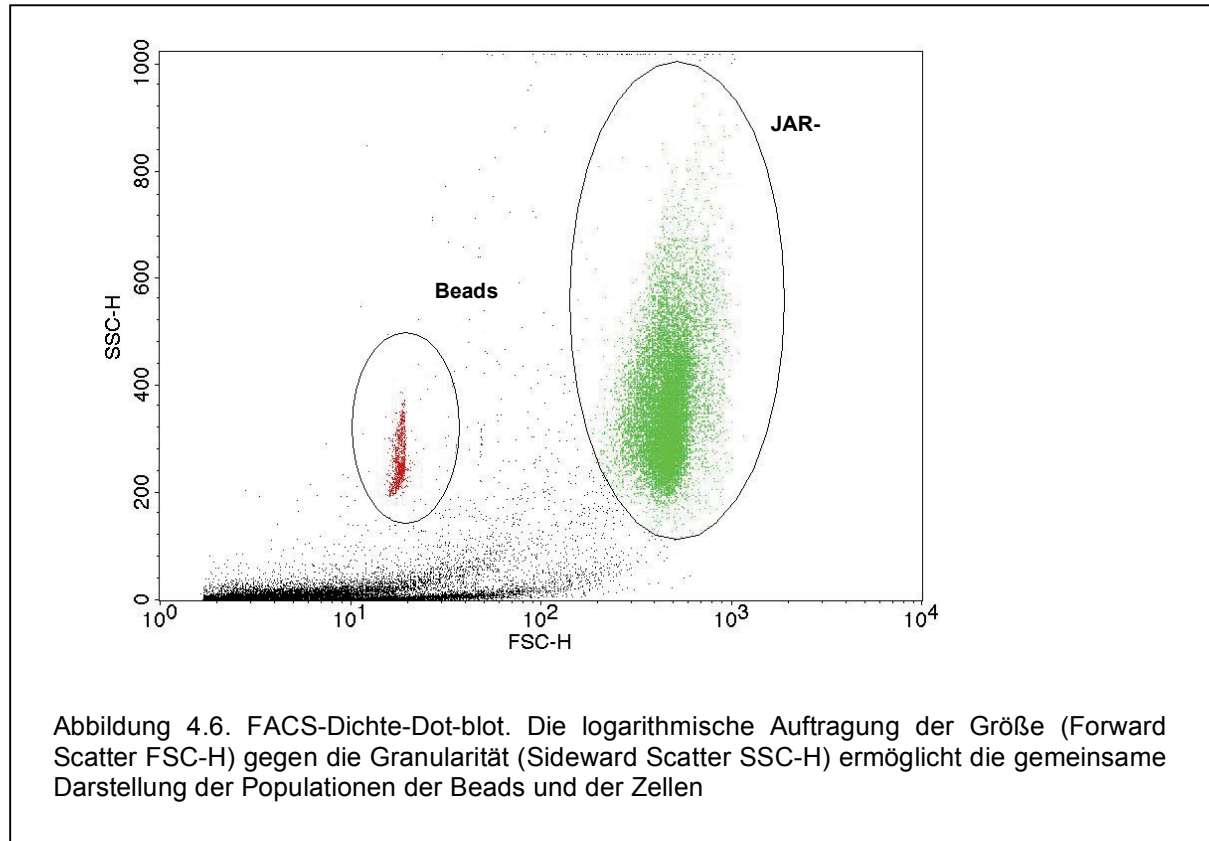
Der Invasionsassay erfolgt analog zum Migrationsassay (s.o.). Der Unterschied besteht darin, dass man den Boden der verwendeten Inserts mit 50 µl Matrigel<sup>TM</sup>-Lösung (1:10 mit serumfreiem DMEM verdünnt) beschichtet. Matrigel stellt eine Rekonstruktion der Basalmembran dar. Nach einer 4-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur polymerisiert das Matrigel und simuliert somit die extrazelluläre Matrix eines in vivo-Modells. Die invasiven Zellen können diese Schicht verdauen und in die Vertiefung der 24-well-Platte wandern. Diese Zellen werden anschließend, wie zuvor beschrieben, ausgezählt.

### *4.2.5 Durchflusszytometrie*

Die Durchflusszytometrie (FACS - Fluorescence Activated Cell Sorting) ermöglicht eine quantitative und qualitative Analyse von Partikeln wie zum Beispiel Zellen in Bezug auf ihre physikalischen und molekularen Eigenschaften. Mit dieser Methode kann man neben vielen weiteren Anwendungsmöglichkeiten, die Zellen aufgrund ihrer Morphologie unterscheiden. Dabei können durch die Lichtbeugung Informationen über Zellgröße, Zellform und die Innenstruktur (Granularität des Zellplasmas) gewonnen werden. Dazu werden suspendierte Zellen zunächst durch eine Kapillare in das Gerät gesaugt, wo sie, vereinzelt durch hydrodynamische Fokussierung, einen Laserstrahl passieren. Die Zellen streuen einen Teil des Laserlichtes, was mittels Photomultipliern detektiert wird. Da jedes Signal von einer einzigen Zelle stammt, kann über die Anzahl der detektierten Signale die Zellzahl ermittelt werden. Zwei Parameter werden dazu unterschieden: Das Vorwärtstreulicht FSC (Forward Scatter) wird durch Beugung des Lichts hervorgerufen und dient als Maß für die Zellgröße, das Seitwärtstreulicht SSC (Side Scatter) wird durch Brechung des Lichts hervorgerufen und dient als Maß für die Granularität (Abb. 4.6). Neben der Detektion der Lichtstreuung kann man mit diesem Gerät auch Fluoreszenzen registrieren. Diese Fähigkeit wurde in dieser Arbeit für die Detektion mit einer Cy3 markierten siRNA Transfizierten Zellen genutzt.

Um die Proliferation, Migration und Invasion der Zellen zu untersuchen, werden die Zellen mit Hilfe von Trucount<sup>TM</sup> Tubes gezählt. Die Beads in den Trucount<sup>TM</sup> Tubes werden in PBS gelöst und eine definierte Anzahl Beads (Beads<sub>gesamt</sub>) wird mit der

Zellsuspension ( $\text{Zellzahl}_{\text{gesamt}}$ ) gemischt. Während der Messung werden die Beads ( $\text{Beads}_{\text{gezählt}}$ ) parallel zu den Zellen ( $\text{Zellzahl}_{\text{gezählt}}$ ) ausgezählt und können später wegen ihrer abweichenden Größe von Letzteren unterschieden werden (Abb. 4.6).



Anschließend wird die Anzahl der in der Suspension vorliegenden Zellen mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl}_{\text{gesamt}} = \frac{\text{Beads}_{\text{gesamt}} \times \text{Zellzahl}_{\text{gezählt}}}{\text{Beads}_{\text{gezählt}}}$$

Soll allerdings eine Transfektionseffizienz in % ermittelt werden, ist der Zusatz von Beads nicht nötig. Hier werden parallel fluoreszierende und nicht-fluoreszierende Zellen gezählt.



#### 4.2.6 Immunzyto- und Immunhistochemie

Immunzyto- und Immunhistochemie werden durchgeführt in Chorionkarzinom-Zelllinien sowie in Plazentagewebe zum Nachweis der Expression und Phosphorylierung von Signaltransduktionsmolekülen, die potentiell an der Regulation der Invasion von Trophoblastzellen beteiligt sind (Tyrosin- und Serin-Phosphorylierung, sowie Expression von STAT3, STAT1, PIAS1, PIAS3 u.a.). Weiterhin wurde die Methode verwendet um einen erfolgreichen „Knock down“ der PIAS-Isoformen in Chorionkarzinom-Zelllinien darzustellen.

Alle Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dipl. Biologin Maja Weber durchgeführt.

Bei der Immunzytochemie und Immunhistochemie handelt es sich um eine Methode, bei der Proteine durch die Ausnutzung spezifischer Antigen-Antikörper-Bindungen identifiziert werden können. Dabei werden die Proteine mit Hilfe von Antikörper sichtbar gemacht. Man unterscheidet zwischen Fluoreszenzdetektion und enzymatischem Nachweis.

Die Fluoreszenzdetektion wird in zwei Schritten durchgeführt. Als Erstes wird das zu untersuchende Antigen mit einem spezifischen Antikörper inkubiert, was zur spezifischen Bindung des Antigens führt. Im zweiten Schritt wird ein spezifischer Fluorochrom-markierter Sekundärerantikörper zugegeben, der spezifisch an den primären Antikörper bindet. Die weitere Auswertung erfolgt mittels Fluoreszenzmikroskopie. Hierbei handelt es sich um einen indirekten Nachweis des Proteins. Eine andere Variante wäre der direkten Nachweis. Bei dieser Methode wird ein spezifischer primärer Antikörper verwendet, welcher direkt mit einem Fluorochrom konjugiert ist.

Bei dem enzymatischen Nachweis handelt es sich um eine Methode, die die hohe Affinität von Streptavidin und Avidin für Biotin nutzt. Die Detektion des Antigens erfolgt durch einen unmarkierten Primärantikörper. Der Primärantikörper wird spezifisch von einem Biotin-haltigen Sekundärantikörper gebunden. In einem weiteren Schritt bindet der ABC-Komplex (Avidin-Biotin-Enzym-Komplex) an den Sekundärantikörper. Durch ein lösliches Chromogen, Enzym oder Substrat erfolgt der Farbumschlag. Für die Farbreaktion werden Peroxidasen oder Alkalische

Phosphatasen verwendet. Als Substrat wird Wasserstoffperoxid eingesetzt. Bei der Reaktion erfolgt die Freisetzung von Protonen. Dadurch wird das Chromogen oxidiert und ein farbiges Endprodukt gebildet.

#### Durchführung der Immunzytochemie mit Fluoreszenzdetektion

Immunzytochemie wird durchgeführt zum Nachweis der Expression von bestimmten Proteinen in verschiedenen Trophoblast- und Chorionkarzinomzelllinien.

Dafür werden die Zellen in DMEM-Medium mit Hilfe von Poly-L-Lysin, verdünnt 1:1000 mit GBSS (Gey's balanced salt solution), auf Objektträger gebracht. Nach der Inkubation über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> werden die Zellen für eine Stunde in 4% Paraformaldehyd bei 4°C fixiert. Nach der Fixierung werden die Objektträger in PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu blockieren werden die Objektträger für 1 h mit 5% Ziegsenrum (verdünnt in PBS/Tween 20) und danach 10 min mit Zymed-Blockierlösung geblockt. Anschließend folgt die Inkubation mit dem Primärantikörper (siehe Tabelle) bei 4 °C über Nacht. Am darauf folgenden Tag werden die Proben mit PBS gewaschen und mit dem Fluorochrom Cy3 gekoppelten Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach weiterem Waschen mit PBS werden die Zellkerne mit 50µl Mounting Medium, welches 1,5 µg/ml DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid) enthält, gegengefärbt. Die Objektträger werden anschließend mit Deckgläschen verschlossen. Die fertigen Proben werden im Dunkeln bei 4°C gelagert und am Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2 - „Zeiss“) ausgewertet.

Primärer Antikörper	Firma	Verdünnung
Anti-STAT3	Cell Signalling	1:100
Anti-phosphoSTAT3(Tyr705)	Cell Signalling	1:100
Anti-phosphoSTAT3(Ser727)	Cell Signaling	1:100
Anti-PIAS1/3		1:100

#### Durchführung der Immunhistochemie mit Fluoreszenzdetektion

Die fertigen Objektträger mit Plazentagewebsschnitten wurden freundlicherweise von Dipl. Biologin Maja Weber zur Verfügung gestellt.

Die Proben werden über Nacht in einer feuchten Kammer, bei 4°C, mit dem Primärantikörper inkubiert. Um die überschüssigen ungebundenen Antikörper zu entfernen, werden die Objektträger am folgenden Tag 3 x 5 min in 0,1 M PBS (pH 7,2-7,4) gewaschen und anschließend für 1 h mit dem fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper inkubiert. Nach weiterem Waschen mit PBS werden die Zellkerne mit DAPI-haltigem Mounting Medium gegengefärbt. Die Objektträger werden anschließend mit Deckgläschen verschlossen. Die fertigen Proben wurden im Dunkeln bei 4°C gelagert und am Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2 - „Zeiss“) ausgewertet.

#### Durchführung der Immunzytochemie mit Peroxidaseprotokoll

Die adhärennten Zellen werden mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Ethanol/Methanol-Mischung (1:1) 5 min fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wird die endogene Peroxidase durch 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gelöst/verdünnt in Methanol geblockt. Um die unspezifischen Bindungen zu blockieren, werden die Proben nach einem weiteren Waschschriff für 20 min mit Blockierungsserum inkubiert. Danach erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper für 1h. Nach erneutem Waschen mit PBS werden die Proben mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Anschließend folgt ein weiterer Waschschriff und die Inkubation der Zellen mit dem ABC-Komplex und die Substratfärbung mit DAB. Danach werden die Zellen noch einmal mit PBS gewaschen und mit Hämalaun sauer nach Mayer für 1-2 min gefärbt. Die Proben werden zu letzt dehydriert um diese anschließend mit Histofluid® ein zu decken. Die fertigen Proben wurden im Dunkeln bei 4°C gelagert und am Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2 - „Zeiss“) ausgewertet.

#### **4.2.7 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung und die graphische Darstellung der Daten werden mit Hilfe der Software MS Excel durchgeführt. Dabei werden die Werte durch die Berechnung des Mittelwertes und des Standardfehlers zusammengefasst. Signifikanzen werden mit Hilfe des Student's t-Test für gepaarte Proben berechnet. Die Ergebnisse wurden als signifikant betrachtet bei  $p < 0,05$ .

## 4.3 Geräte und Reagenzien

### 4.3.1 Geräte

Autoklav	KSG-112-Olching
Blot-Kammer	Biometra
Brutschrank	Heraeus CO <sub>2</sub> Inkubator
Elektrophoresekammer	PEQLAB Biotechnology GmbH
Thermomixer comfort	Eppendorf
Durchflusszytometer "FACSCalibur"	Becton-Dickinson
Zentrifugen	Biofuge 13 (Heraeus)
	Labofuge T (Heraeus)
	Mikro 22R (Hettich)
	Universal 30 F (Hettich)
Waage	Basic Satorius
	Owa Labor VEB Wägetechnik Rapido
Mikroskop	Axiovert 25 HBO 50/AC (Zeiss)
	Axioplan 2 (Zeiss)
Mikroskop (Fluoreszenz)	Axioplan 2 - „Zeiss“
Gel-Dokumentationsgerät	MF-ChemiBIS 3.2 Biostep
Gel-Auswertungsprogramme	
Heizplatte MR 3001	Heidolph
Orbitalschüttler Polymax 1040	Heidolph
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Mikroporator MP-100	Peqlab
Neubauerkammer	Optik Labor
Spektrophotometer Cary UV 50	Bio Varian
Steribank Steril GARD Hood	Baker Company
Pipetten	Eppendorf, Gilson, Hirschmann
Micro Plate Reader MPR A4	Dementitec Diagnostics
Wasserbad	Huber Medingen
Filmkassette	Kisker

### 4.3.2 Verbrauchsmittel

Eppendorf Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2ml)	Sarstedt
Zellkulturflaschen (50 ml; 250 ml)	Greiner
Zellkulturplatten (6-; 12-; 24-; 96-well)	Greiner
PP- Testtubes Falcon (15 ml; 50 ml)	Greiner
Filme	
Hyperfilm	Amersham Pharmacia Biotech
MIN-R 2000	Kodak
Petrischalen	Greiner
Küvetten	Sarstedt
Membran PVDF Hybond-C Extra	Amersham Pharmacia Biotech
Trucount™ Tubes	Becton-Dickinson
Filter Ultrafree-15	Millipore
Membran Hybond-C	Amersham Pharmacia Biotech

### 4.3.3 Reagenzien

Acrylamid 40%	Roth
Antibiotic Antimycotic Solution (AAS)	SIGMA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
BIO-RAD PROTEIN ASSAY	Bio-Rad Laboratories
Chemiluminescent Detection Reagent “LumiGLO“	Cell Signalling Technology
Deionisiertes H <sub>2</sub> O Millipore Synergy UV	Bedford
DMSO	MP Biomedicals
EDTA	Sigma
Electrolytic Buffer	Peqlab
Entwicklungs- und Fixierlösung	Kodak
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
FACS Clean	BD
FACS Flow	BD

FACS Lysing	BD
FACS Rinse	BD
Fetales Kälberserum	Bio Whittaker
GBSS	SIGMA
Gelatine	Roth
Glycerin	Roth
HBSS	Bio Whittaker
Hepes	Molecular biology Sigma®, St. Louis
Human LIF	Chemicon
Human IL-6	Hiss Diagnostics
Human HGF	Hiss Diagnostics
Matrigel	BD
MeOH HPLC Gradient Grade	Roth
Molekulargewichtsmarker (Roti-Standard)	Cell Signalling Technology
Molekulargewichtsmarker (Dual Color)	BIO-RAD
Natriumazid	Roth
Nanofectin Diluent	PAA
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdodesylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	J.T. Baker
Nuklease-freies Wasser	Ambion
Oligofectamin™ Reagent	Invitrogen
Optimem	Gibco
Paraformaldehyd	Sigma
Penicillin/Streptomycin (Pen./Strep.)	PAA
PBS	Biochrom AG
Percoll™	Amersham Biosciences
Poly-L-Lysin	SIGMA
Ponceau S	Roth
Protease Inhibitor Cocktail	SIGMA
Sodiumdodecylsulfat	Roth
5x siRNA Annealing Buffer	Ambion
TEMED	Pharmacia Biotech
Tris-Base	Sigma
Tris-HCL	Sigma

TritonX	USB
Trypanblau	Sigma
Trypsin EDTA	Lonza
TWEEN 20	Roth
Zell-Lysepuffer	Cell Signalling Technology

#### 4.3.4 Zellkulturmedien

DMEM	Bio Whittaker
- DMEM Medium I: (DMEM + 10% FKS + 2% AAS)	
- DMEM Medium II: (DMEM + 30% FKS)	
RPMI 1640	PAA
- RPMI 1640 Medium: (RPMI 1640 + 5% FKS)	
Optimem	Bio Whittaker

#### 4.3.5 Antikörper

##### Primärantikörper für Western-blot

Mouse monoclonal anti-human IgG2b SOCS3 (SO1)	Santa Cruz Biotechnology
Rabbit monoclonal anti-human $\beta$ -Aktin	Cell Signaling Technology
Rabbit anti-human Phospho-STAT3 (Tyr-705)	Cell Signaling Technology
Rabbit monoclonal anti-human STAT3	Cell Signaling Technology
Rabbit monoclonal anti-human STAT1	Cell Signaling Technology
Purified Rabbit Polyclonal PIAS1 (N-term)	ABGENT
Purified Rabbit Polyclonal PIAS3 (N-term)	ABGENT
Goat polyclonal IgG PIAS 1/3 (N-18)	Santa Cruz Biotechnology
Rabbit polyclonal anti-human Jak1	Cell Signaling Technology
Rabbit polyclonal anti-human Jak3	Cell Signaling Technology

HRP-konjugierte Sekundärantikörper

Anti-rabbit IgG	Cell Signaling Technology
Anti-mouse IgG	Cell Signaling Technology
Donkey anti-goat IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology

Primärantikörper für Immunzytochemie

Rabbit polyclonal anti-human IgG SOCS3 (H-103)	Santa Cruz Biotechnology
Goat polyclonal IgG PIAS 1/3 (N-18)	Santa Cruz Biotechnology

Fluoreszenz-konjugierte Sekundärantikörper

Goat anti-rabbit IgG-Cy3	Dianoya
--------------------------	---------

Antikörper für die Reinigung der Trophoblasten

Monoklonal Mouse Anti-Human CD3	Dako
Monoklonal Mouse Anti-Human CD9	Dako
Monoklonal Mouse Anti-Human CD14	Dako
Monoklonal Mouse Anti-Human CD31, Endothelial Cell	Dako
Monoklonal Mouse Anti-Human CD45	Immuno Tools
Dynabeads M-450 Goat anti-Mouse IgG	Dynal Biotech

**4.3.6 Transfektionsreagenzien**

HiPerfect™ Transfektions-Kit	Qiagen
Lipofectamine™ Transfektions-Kit	Invitrogen
Nanofectin Diluent	PAA
Oligofectamine™ Transfektions-Kit	Invitrogen
Gene Silencer Transfection Reagent	Genlantis
Gene Silencer siRNA Diluent	Genlantis
FuGENE HD Transfection Reagent	Roche
ICAFectin™ 442 Transfektions-Kit	Eurogentec



Scrambled-Oligos Sequenzen:

## Stat3-Kontrolle

Sense : 5'GCC ACU UAU AAA UUC GUU Ctt 3'  
Antisense : 5'GAA CGA AUU UAU AAG UGG Ctt 3'

## HLA-G-Kontrolle

Sense : 5'AGA GUG GUA ACG GAC AAG Utt 3'  
Antisense : 5'ACU UGU CCG UUA CCA CUC Utt 3'

*4.3.7 Herstellung benötigter Reagenzien*Western-blot Reagenzien/Stammlösungen1. 10x Running Buffer

1 L Stammlösung:	nach Verdünnung auf 1x-Puffer:
-29,04 g Tris Base	→ 24 mM Tris Base
-142,5 g Glycine	→ 190 mM Glycine
-10 g SDS	→ 0,1 % SDS
→Einstellen mit 1 M HCl auf pH 8,5	
→ nachträglich verdünnen auf 1x Puffer	

2. 10x Tris Glycine Puffer

-1 L Stammlösung	
-14,54 g Tris Base	→120 mM Tris Base
-72,07 g Glycine	→960 mM Glycine

3. 1x Blotpuffer:

- 1 l Stammlösung
- 100 ml 10x Tris/Glycine-Puffer
- 200 ml Methanol
- auf 1 Liter auffüllen

#### 4. 10x TBS Puffer:

-500ml Stammlösung

-6,06g Tris Base (M:121,14)	→100 mM Tris
-7,88g Tris HCL (M:157,6)	→100mM Tris HCL
-20g NaCl	→1,37 M NaCl

→Einstellen auf pH 7,6

Vorschlag: 100%Tris HCL=200mM=15,76g/500ml ansetzen +10%Tris Base  
=200mM=2,42g/100ml dazusetzen→leichtere pH-Einstellung + gute Pufferung!

#### 5. Ponceau S:

(Proteinfärbung auf Western-blot-Membran)

0,1 % (w/v) in 5 % Essigsäure

(1g Ponceau S, 50 ml Essigsäure in 1 l A. dest.

→ 0,05 g, 2,5 ml in 50 ml )

bei 4 °C lagern

- Hintergrund entfärben mit A. dest.
- Entfärben mit NaOH ( 4 g NaOH auf 500 ml a. dest.)

#### 6. Ponceau-S-Entfärber:

0,8% (w/v) NaOH

#### 7. 10 x Net-G (Block-, Antikörper- und Waschpuffer)

-1 L Stammlösung

nach Verdünnung auf 1x-Puffer:

- 87,66 g NaCl	→ 1,5 M NaCl
- 14,61 g EDTA	→ 0,05 M EDTA
- 60,58 g Tris Base	→ 0,5 M Tris Base pH=7,5
- 2 g Gelatine	→ 0,2 % Gelatine
→ in Wasser lösen und erwärmen	
- 5 g Triton X	→ 0,5 % Triton X
→ zum Schluss zugeben	

8. Blocking Puffer 2: Milchpuffer

5% Skimmed Milk in PBS Tween (Blockpuffer)

2,5g                      Milchpulver in 50 ml PBS Tween

3% Skimmed Milk in PBS Tween (Antikörperpuffer)

1,5g                      Milchpulver in 50 ml PBS Tween

Acrylamidgelkomponenten

86% Glycerin , LowerTris, A. dest., UpperTris, 40%APS, Temed

Lower Tris: - 36,3 g Tris

- 8 ml 10% SDS

- mit Aqua dest. auf 180ml auffüllen

- mit konzentrierter HCL auf pH 8,8 einstellen

- mit Aqua dest. auf 200ml auffüllen

Upper Tris: - 6,06 g Tris

- 4 ml 10% SDS

- mit Aqua dest. auf 90 ml auffüllen

- mit konzentrierter HCL auf pH 6,8 einstellen

- mit Aqua dest. auf 100ml auffüllen

5 x Auftragspuffer:

50 mM              Tris-HCL

2%                  SDS

0,002%            Bromphenolblau

0,1 M              DTT

10% (w/v)        Glycerin

Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE

	Sammelgel (1X)	Trenngel 7,50% (1X)	Trenngel 12% (1X)
AA/BAA 40% (Roth)	250 µl	940 µl	1,5 ml
4x Lower Tris		1,25 ml	1,25 ml
4x Upper Tris	625 µl		
87% Glycerin		1 ml	1 ml
A.dest	1,6 ml	1,81 ml	1,25 ml
40% APS	9 µl	10 µl	10 µl
TEMED	9 µl	6 µl	6 µl

AA: Acrylamid; APS: Ammoniumpersulfat; BAA: Bisacrylamid; TEMED: N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin

Trophoblastisolierung Reagenzien/Stammlösungen

## 1. Lösungen:

## a) Waschlösung:

HBSS/Dubellco PBS : 500 ml  
 AAS : 2% (ca. 10.2 ml)

## b) Digestivlösung (Verdauungslösung):

HBSS/Dubellco PBS mit AAS 2% : 500 ml (Endvolum)  
 Trypsin : 1:250 (0.625 g in 500 ml)  
 HEPES 1 M : 12,5 ml

## 2. Percoll-Gradient: 60%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 10% in HBSS

Immunzyto- und histochemie Reagenzien/Stammlösungen

## Geräte:

Computerprogramm	AxioVision Rel. 4,5
Fluoreszenzlampe	HBO 100W
Kamera AxioCam HRc	Zeiss
Mikroskop Axioplan 2	Zeiss

## Verbrauchsmaterial:

Deckgläschen	Menzel-Gläser
Klarlack	
Objektträger Super Frost Ultra Plus®	Menzel-Gläser

## Chemikalien und Reagenzien

Poly-L-Lysin	
GBSS (Gey`s balanced salt solution)	
ABC-Ellite Kit (Rabbit IgG)	VectaStain
Cas- Block	Zymed
DAB	DAKO
Ethanol (absolut)	Roth
Ethanol (vergällt)	Nordbrand Nordhausen GmbH
Ziegenserumserum	DAKO
Hämalaun sauer nach Mayer	Roth
Histofluid	SERVA
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Methanol	Roth
Mounting Medium mit DAPI	Vectashield
di-Natriumhydrogphosphat- Dodecahydrat	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Paraformaldehyd	Sigma
PBS	Biochrom
Sodium-Citrat	Merck
Tween20	Roth
Ultra V Block	LAB VISION

Verdünnungsmedium für AK	DAKO
Wasserstoffperoxid 30% (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Roth
Xylol	Merck

## Antikörper:

## primäre AK

STAT3	Cell Signaling
Phospho-STAT3(Tyr705)	Cell Signaling
Phospho-STAT3(Ser727)	Cell Signaling
PIAS1/3	

## sekundäre AK

Anti-Rabbit-IgG sources goat linked with Cy3	Dianova
Anti-Rabbit-IgG sources goat linked with Biotin	Rockland
Ziege-Anti-Maus IgG linked with Cy3	Dianova
Ziege-Anti-Maus IgG linked with Cy2	Dianova

## Zusammensetzung von Puffern:

## Citrat-Puffer 1

1,47g Natrium-Citrat auf 500ml destilliertes Wasser  
pH6,0 mit HCl einstellen

## Citrat-Puffer2

18ml Citrat acid (0,1M) + 82ml Na-Citrate (0,1M) + 900ml destilliertes Wasser

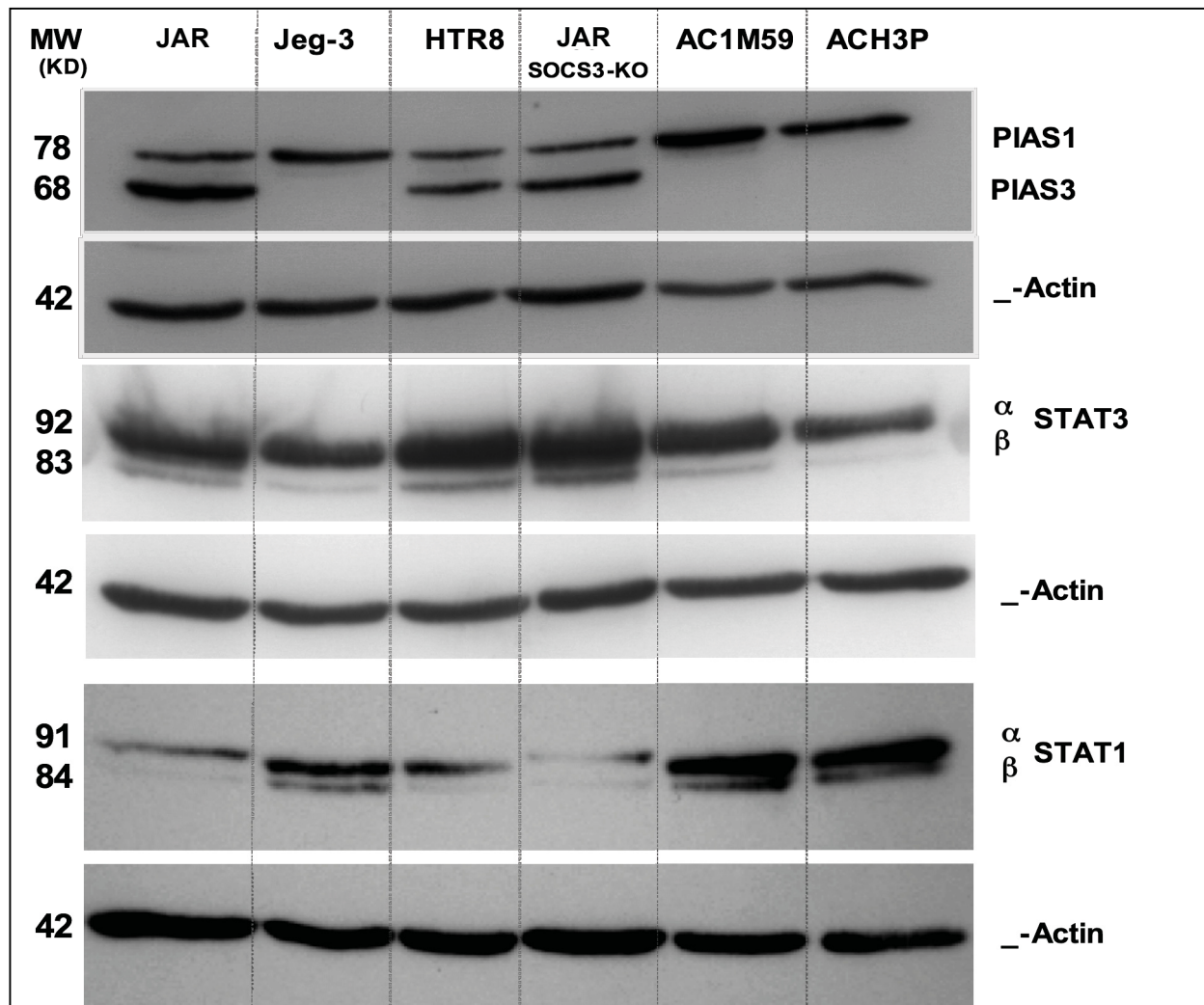
## PBS 10x = 1M

87,9g Natriumchlorid  
2,74g Kaliumdihydrogenphosphat  
11,35g di-Natriumhydrogenphosphat- Dodecahydrat  
in 1Liter destillierten Wasser  
pH 7,2

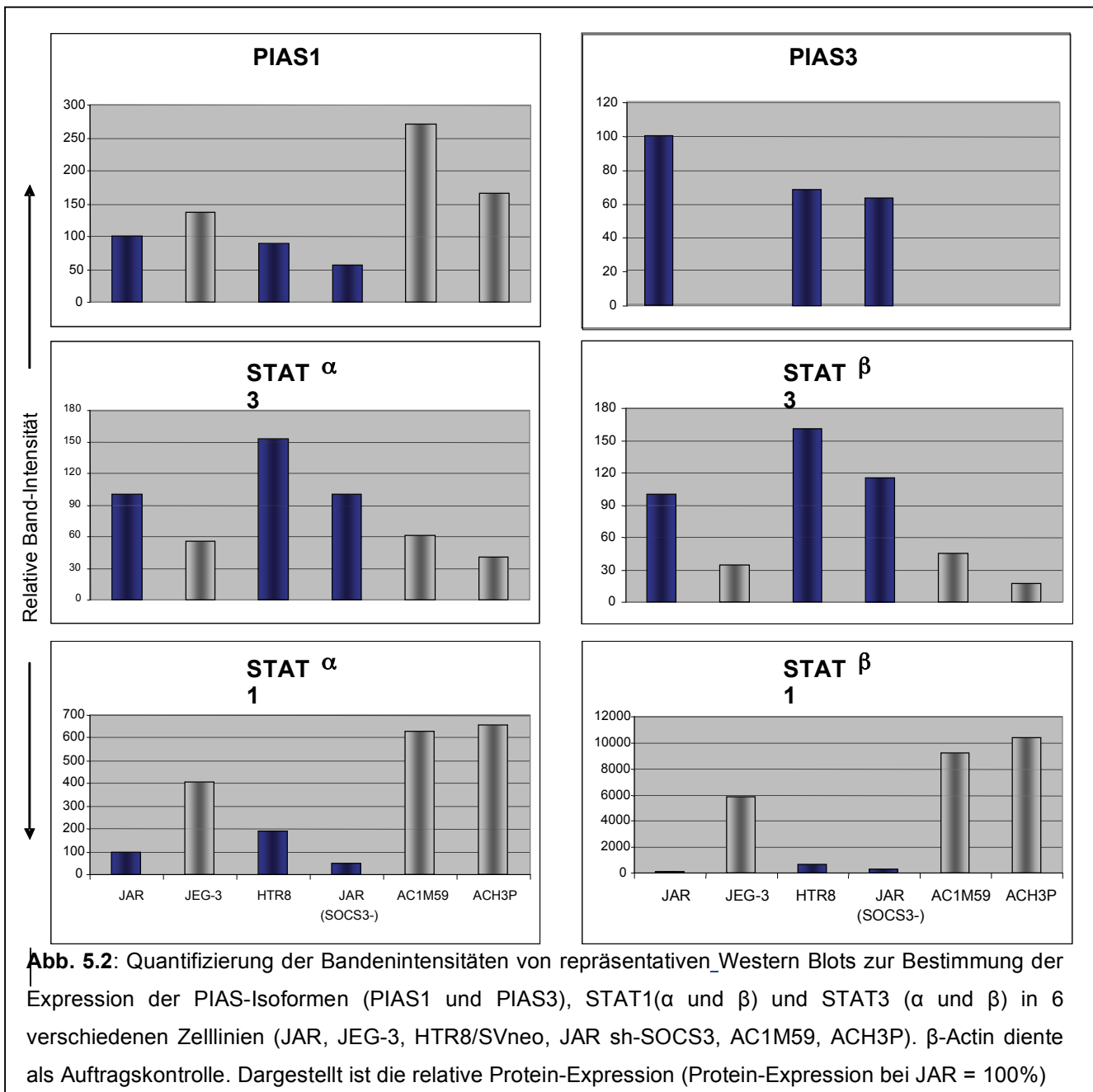
## 5. Ergebnisse

### 5.1 Expression der PIAS-Isoformen, STAT1 und STAT3 in verschiedenen Zelllinien

Mit Hilfe des Western Blot sollte die Expression von PIAS-Isoformen, STAT1 und STAT3 in 6 verschiedenen Zelllinien gezeigt werden. Als Kontrollprotein wurde  $\beta$ -Actin auf den gleichen Membranen nachgewiesen und die Ergebnisse von PIAS1, PIAS3, STAT1( $\alpha$  und  $\beta$ ) und STAT3 ( $\alpha$  und  $\beta$ ) dazu standardisiert (Abb. 5.1 und 5.2). Die Intensitäten der Protein-Banden wurden mit Hilfe eines Geldokumentationssystems mit zugehöriger Software ermittelt.



**Abb. 5.1:** Western Blot zur Messung der Expression der PIAS-Isoformen (PIAS1 und PIAS3), STAT1( $\alpha$  und  $\beta$ ) und STAT3 ( $\alpha$  und  $\beta$ ) in 6 verschiedenen Zelllinien (JAR, JEG-3, HTR8/SVneo, JAR sh-SOCS3, AC1M59, ACH3P).  $\beta$ -Actin diente als Auftragskontrolle.



Es konnte nachgewiesen werden, dass in JAR, JAR-SOCS3-shRNA und HTR8/SVneo Zelllinien beide PIAS-Isoformen (PIAS1 und PIAS3) exprimiert werden, während in JEG-3, ACH3P und AC1M9 Zelllinien nur PIAS1 vorkommt.

Weiterhin wurde gezeigt, dass bei den Zelllinien, die beide PIAS Isoformen exprimieren (JAR, HTR8/SVneo und JAR sh-SOCS3), die STAT3-Expression (α und β) wesentlich höher ist als bei den Zelllinien, die nur PIAS1 exprimieren (JEG-3, ACH3P, AC1M59). Dagegen verhält sich die STAT1-Expression (α und β) umgekehrt, d.h. bei den Zelllinien, die nur PIAS1 exprimieren, ist das STAT1-Niveau

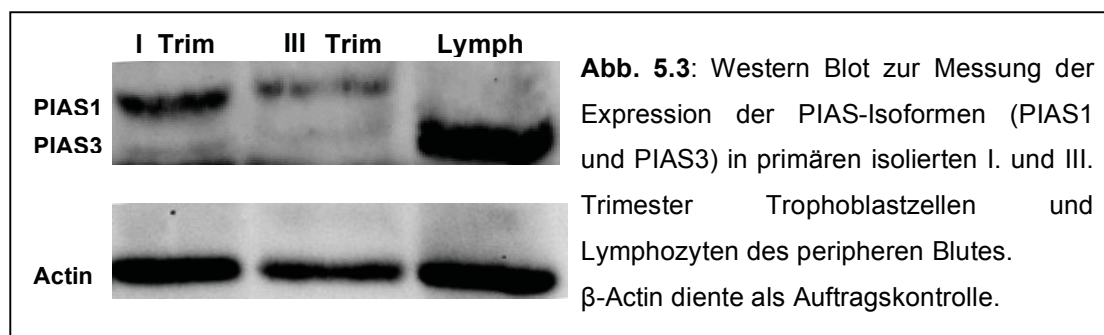


höher als bei den anderen Zelllinien. Alle Ergebnisse wiederholten sich qualitativ in 6 unabhängigen Messungen.

## 5.2 Expression von PIAS in primären isolierten I. und III. Trimester Trophoblastzellen

Als nächstes wurde PIAS-Expression in isolierten primären I. und III. Trimester Trophoblastzellen untersucht. Dafür werden die Trophoblastzellen aus dem villösen Gewebe reifer (37. – 41. SSW) und unreifer (6. – 12. SSW) Plazenten nach einer modifizierten Methode von Kliman isoliert (s. Kapitel 4.1.2.). Um ein falsches Signal durch die Kontamination mit Lymphozyten auszuschließen, wurde eine positiv-Kontrolle von isolierten Lymphozyten des peripheren Blutes verwendet.

Als Kontrollprotein wurde  $\beta$ -Actin auf den gleichen Membranen nachgewiesen und die Ergebnisse von PIAS1 und PIAS3 dazu standardisiert (Abb. 5.3.).

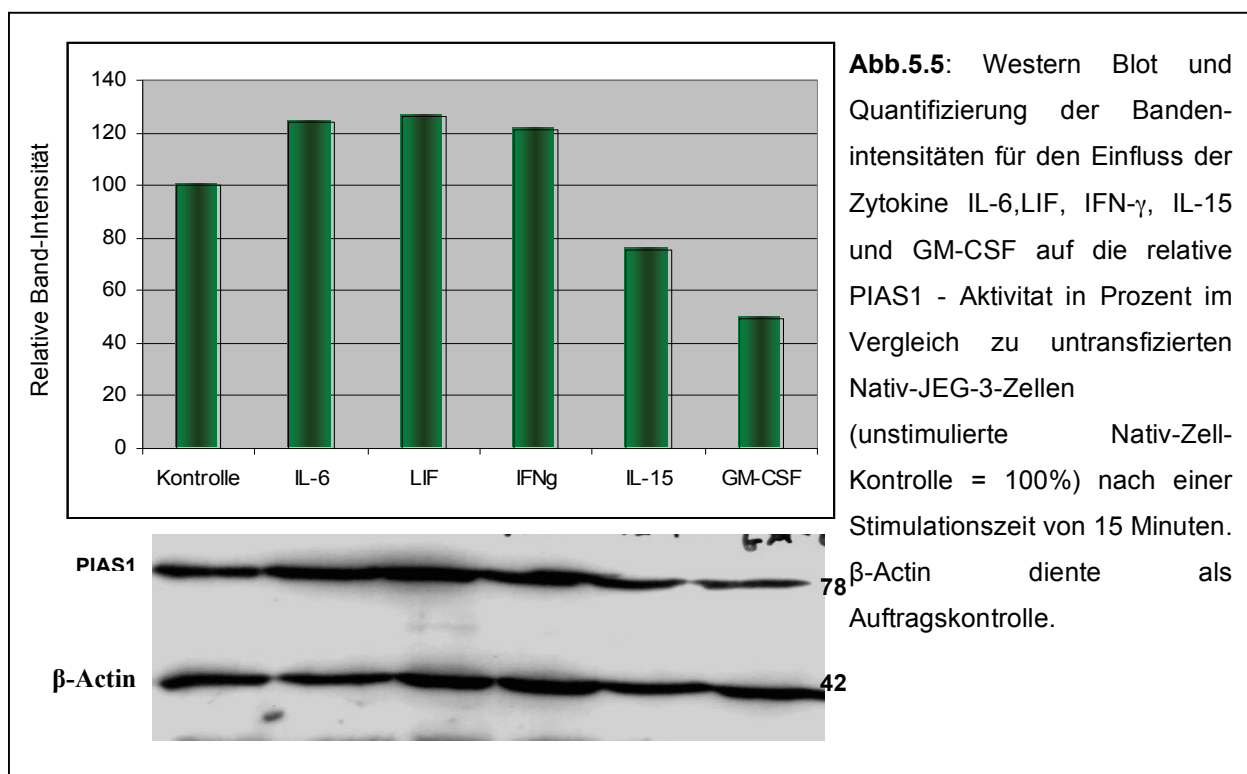
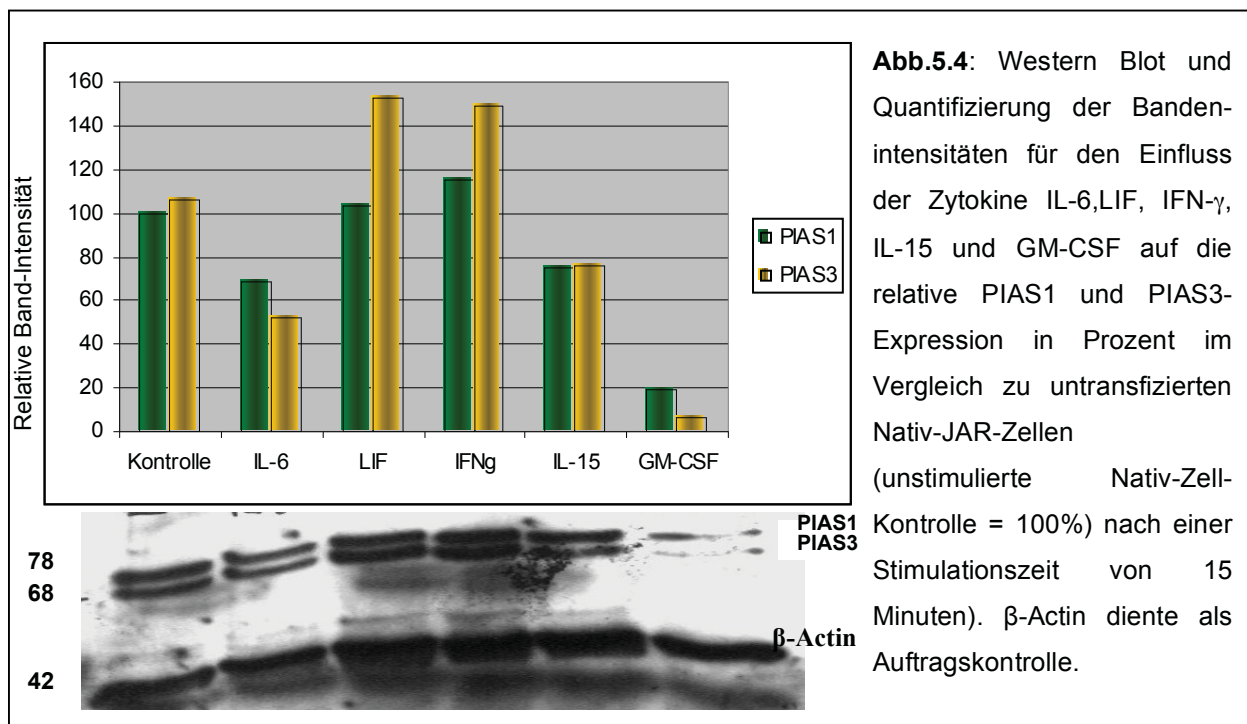


Es ist zu erkennen, dass PIAS3 in primären I. und III. Trimester Trophoblastzellen (bzw. PIAS1 in isolierten Lymphozyten des peripheren Blutes) nicht exprimiert wird.

## 5.4 Induktion der PIAS-Expression durch Cytokine in JAR und JEG-3 Zellen

Es wurde erwartet, dass die Expression von PIAS Molekülen in trophoblastären Zellen durch verschiedene Zytokine induziert werden kann. Weiterhin sollten die Zytokine LIF, IL-6, IL-15, IFN- $\gamma$  und GM-CSF auf ihre Fähigkeit untersucht werden, in JAR und JEG-3 Zellen die Expression von PIAS-Molekülen zu induzieren. Dafür wurden die Zellen kultiviert und ein PIAS1 und PIAS3-Nachweis mittels SDS-PAGE und Western-blot nach 15-minütiger Stimulation der Zellen mit Cytokinen in bestimmter Konzentration (s. Kapitel 4.2.4.1.), sowie ein  $\beta$ -Aktin-Nachweis

durchgeführt. Die Intensitäten der Protein-Banden wurden mit Hilfe eines Geldokumentationssystems mit zugehöriger Software ermittelt.



Es konnte gezeigt werden, dass LIF und IFN- $\gamma$  zu einer Steigerung der PIAS1- und PIAS3-Expression in JAR Zellen (bzw. PIAS1 in JEG-3 Zellen) führen (Abb.5.4 und Abb.5.5).

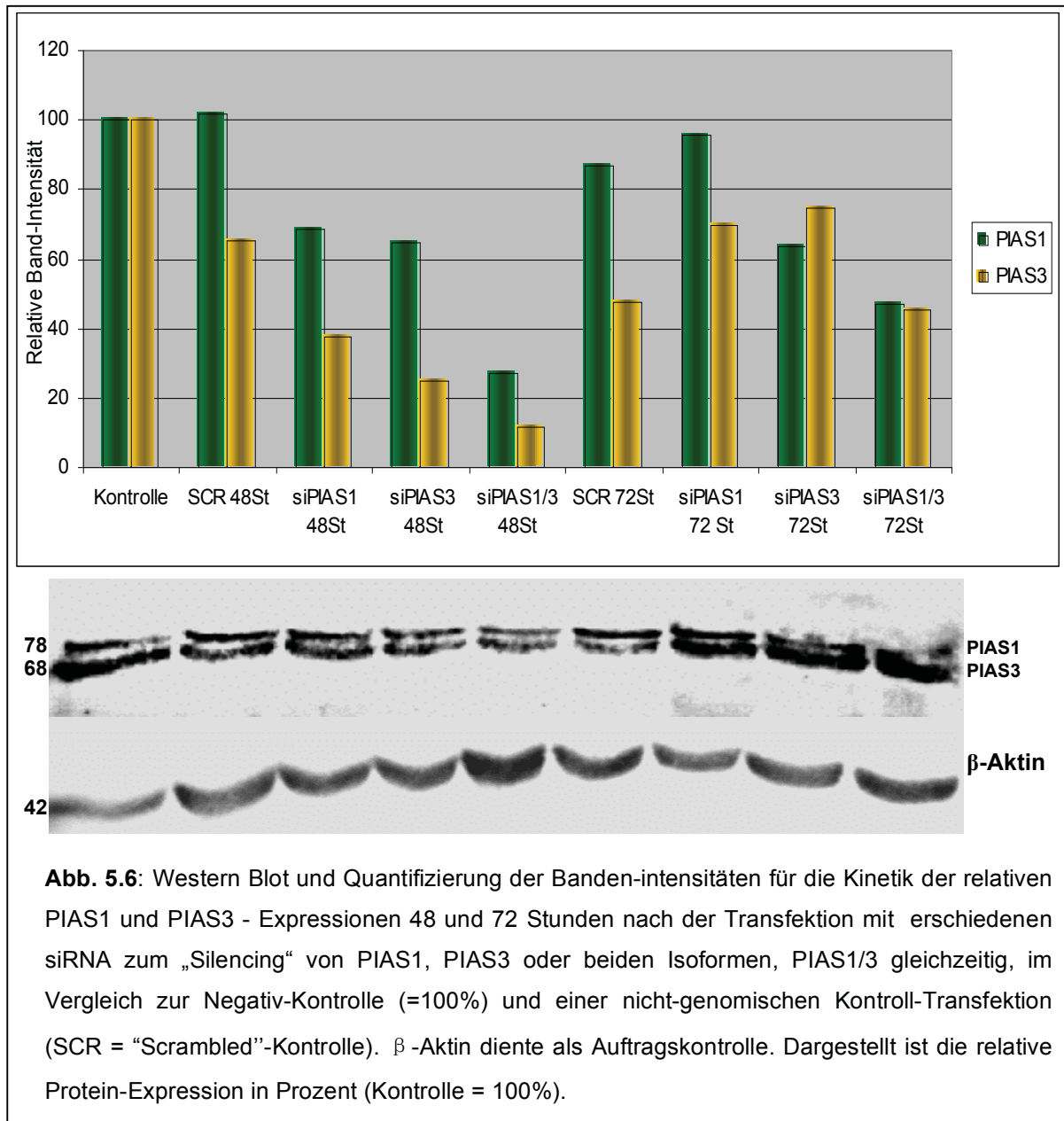
### 5.5 Etablierung des PIAS-„Knockdowns“ in JAR Zellen mittels SDS-PAGE und Western-blot nach 48 und 72h

RNA-Interferenz (RNAi) ist eine effektive Methode, um die Expression und dadurch auch die Funktion der untersuchten Zielgene herunterzuregulieren.

In dieser Arbeit sollte mittels RNAi die Herunterregulierung der Genexpression des Zielgens PIAS in JAR-Zellen etabliert werden, um im weiteren Verlauf anhand verschiedener funktioneller Tests den Einfluss von PIAS auf Verhalten von Zellen untersuchen zu können.

Zuerst wurden Experimente zum Vergleich von verschiedenen Transfektionsreagenzien (HiPerFect<sup>TM</sup>, Oligofectamine<sup>TM</sup>, FuGENE HD, ICAfectin<sup>TM</sup>, Gene Silencer und Nanofectin<sup>TM</sup>) durchgeführt. Die Transfektionsrate wurde mit Hilfe der Cy3-markierten SOCS3-siRNA durchflusscytometrisch bestimmt (s. Kapitel 4.2.2.2 und 4.2.5). Das Ziel war, das optimale Transfektionsreagenz für den Knockdown von PIAS mittels siRNA ausfindig zu machen. Nanofectin<sup>TM</sup> wurde als optimales Transfektionsreagenz ausgewählt (Reduktion über 96%) und in weiteren Experimenten verwendet.

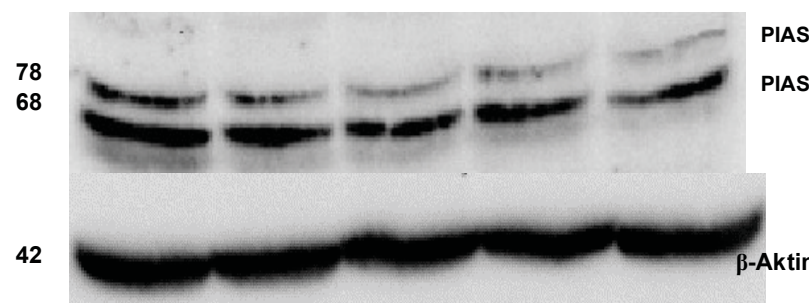
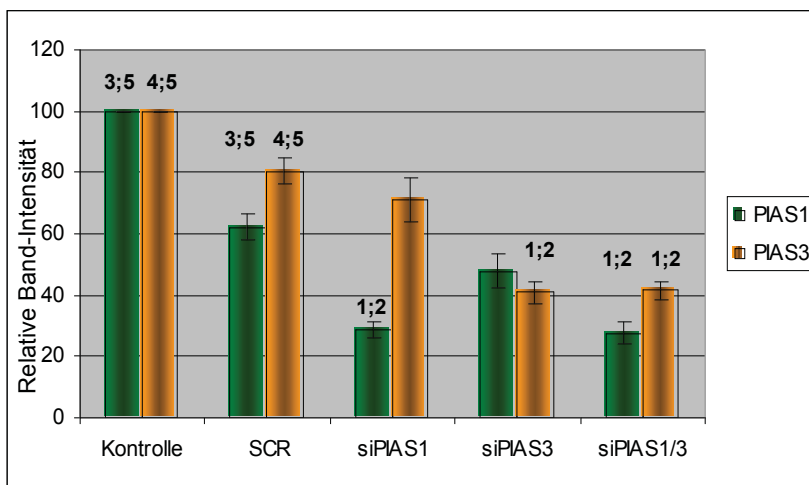
Als nächstes wurden Experimente für Bestimmung der optimalen Transfektionszeit durchgeführt. Mit Hilfe von Nanofectin<sup>TM</sup> wurden JAR-Zellen mit PIAS1 und PIAS3-siRNA (siPIAS1 und siPIAS3) transfiziert. Nach 48 bzw. 72 h erfolgte der Nachweis von PIAS1, PIAS3 und  $\beta$ -Actin, im Vergleich mit untransfizierten und mit nicht-genomischer siRNA transfizierten Kontroll-JAR-Zellen, mittels SDS-PAGE und Western-blot. Die Intensitäten der Protein-Banden wurden mit Hilfe eines Geldokumentationssystems mit zugehöriger Software ermittelt.



Es konnte gezeigt werden, dass 48 h nach Transfektion mit siPIAS1 und siPIAS3 unter Nutzung von Nanofectin™ eine deutliche Reduktion des PIAS-Levels, im Vergleich mit untransfizierter und mit nicht-genomischer Kontrolle, auftritt. Dagegen ist 72 h nach Transfektion kein nennenswerter Effekt mehr auszumachen (Abb. 5.5.).

## 5.6 Nachweis des PIAS-„Knockdowns“ in JAR Zellen nach 48 mittels SDS-PAGE und Western-blot

In diesem Experiment sollte die Expression von PIAS1 und PIAS3 in JAR- Zellen mittels RNAi vermindert werden. Dazu wurden die Zellen mit spezifischen siRNA-Molekülen mit Hilfe von Nanofectin™ 48h transfiziert. Bei jedem „Knock Down“ wurde als Kontrolle eine Probe mit einer nicht-genomischen siRNA transfiziert, um Einflüsse durch den Transfektionsvorgang auszuschließen. Mittels Western Blots wurde die „Knock Down“-Effizienz kontrolliert.



**Abb.5.7:** Western-blot und Quantifizierung der Bandenintensitäten für die Kinetik der relativen PIAS1 und PIAS3 - Expressionen 48 Stunden nach der Transfektion mit PIAS1, PIAS3 und PIAS1/3-siRNA in JAR-Zellen im Vergleich zur Negativ- Kontrolle und einer nicht-genomischen Kontroll-Transfektion (SCR = "Scramled"-Kontrolle). β -Aktin diente als Auftragskontrolle. Dargestellt ist die relative Protein-Expression in Prozent (Kontrolle = 100%).

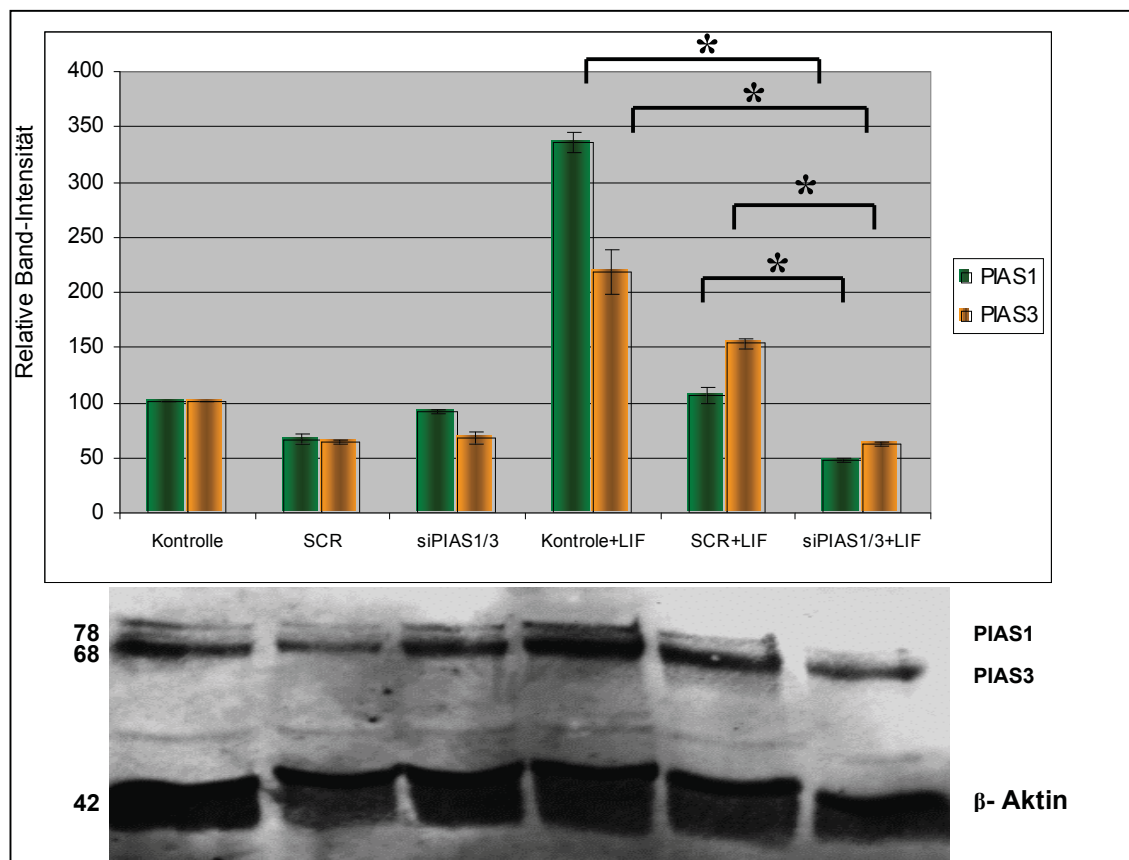
Die Abbildung zeigt den jeweiligen Mittelwert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardfehler. (t-Test, \* $p < 0,05$ ),  $n=3$  unabhängige Versuche. Die Zahlen über den Säulen zeigen an, zu welcher anderen Säule (nummeriert von links nach rechts von 1-5) ein signifikanter Unterschied besteht.

Als Auftragskontrolle ist der β-Aktin-blot mit dargestellt (Abb. 5.7). Die Intensitäten der Protein-Banden wurden mit Hilfe eines Geldokumentationssystems mit zugehöriger Software ermittelt.

Es konnte eine signifikante (\* $P < 0,05$ ) Reduktion der Expression des Zielgens im Vergleich mit der untransfizierten Nativ-Zell-Kontrolle und mit der nicht-genomischen Kontrolle nach 48 Stunden erreicht werden.

Im nächsten Experiment wurden die mit PIAS1/3-siRNA transfizierten Proben, die unstimulierten Zellen und die mit nicht-genomischer siRNA transfizierten Zellen anschließend nach der Transfektion mit LIF (10ng/ml) für 20 min stimuliert und analysiert.

$\beta$ -Aktin diene als Auftragskontrolle. Die Intensitäten der Protein-Banden wurden mit Hilfe eines Geldokumentationssystems mit zugehöriger Software ermittelt.



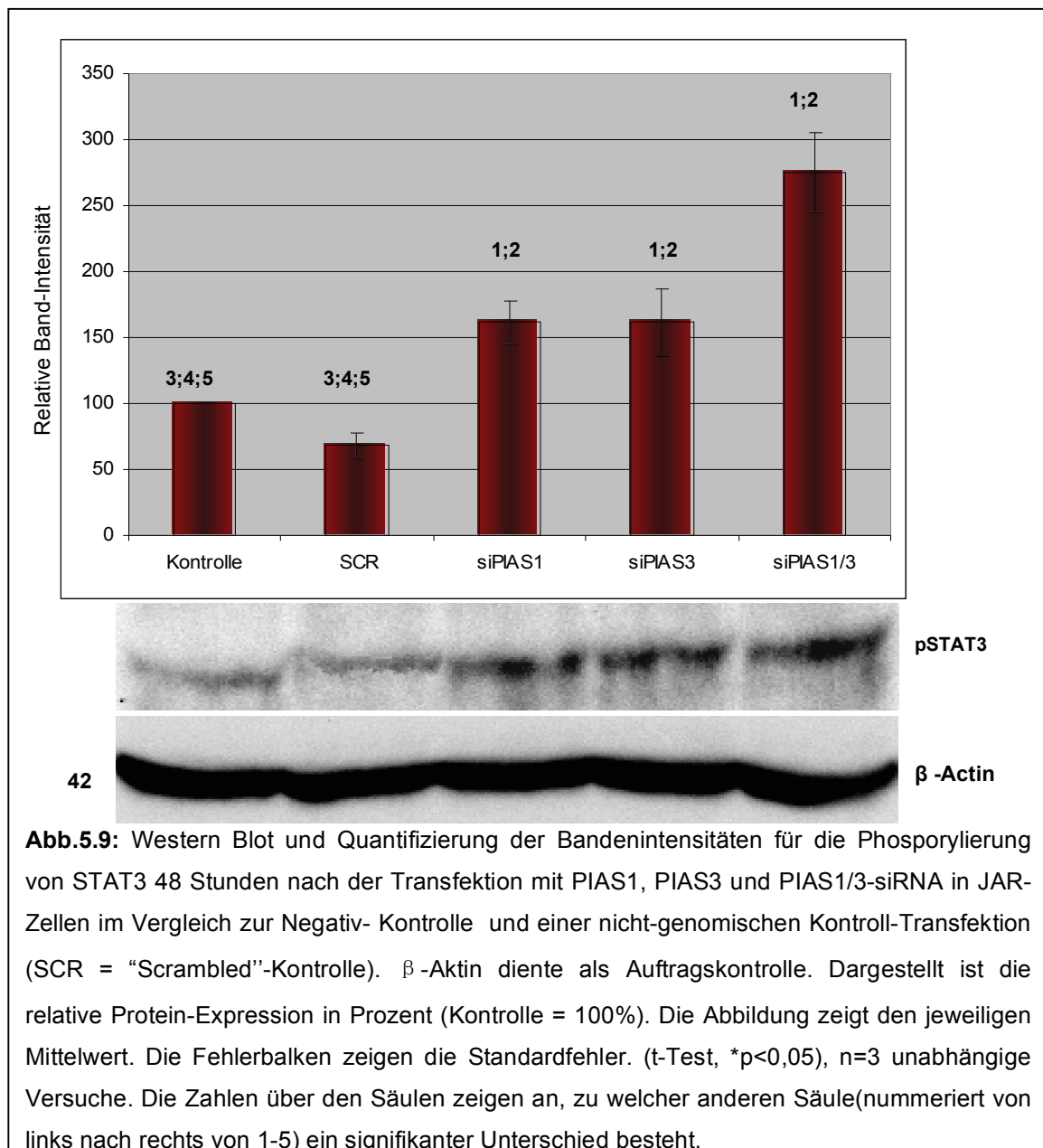
**Abb.5.8.** Western Blot und Quantifizierung der Bandenintensitäten der relativen PIAS1 und PIAS3 - Expressionen 48 Stunden nach der Transfektion mit PIAS1, PIAS3 und PIAS1/3-siRNA und 20 Minuten LIF-Stimulation in JAR-Zellen im Vergleich zur Negativ-Kontrolle und einer nicht-genomischen Kontroll-Transfektion (SCR = "Scrambled"-Kontrolle).  $\beta$ -Aktin diene als Auftragskontrolle. Dargestellt ist die relative Protein-Expression in Prozent (Kontrolle = 100%). Die Abbildung zeigt den jeweiligen Mittelwert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardfehler. (t-Test, \* $p < 0,05$ ),  $n=3$  unabhängige Versuche.

Die Stimulation mit LIF hatte eine gesteigerte PIAS1 und PIAS3-Expression zur Folge. Es ist aber eine signifikante (\* $P < 0,05$ ) Reduktion der Expression von PIAS1

und PIAS3 in mit PIAS1/3-siRNA transfizierten Proben im Vergleich mit der untransfizierten Nativ-Zell-Kontrolle und mit der nicht-genomischen Kontrolle nach 20 Minuten LIF-Stimulation nachweisbar (Abb.5.8).

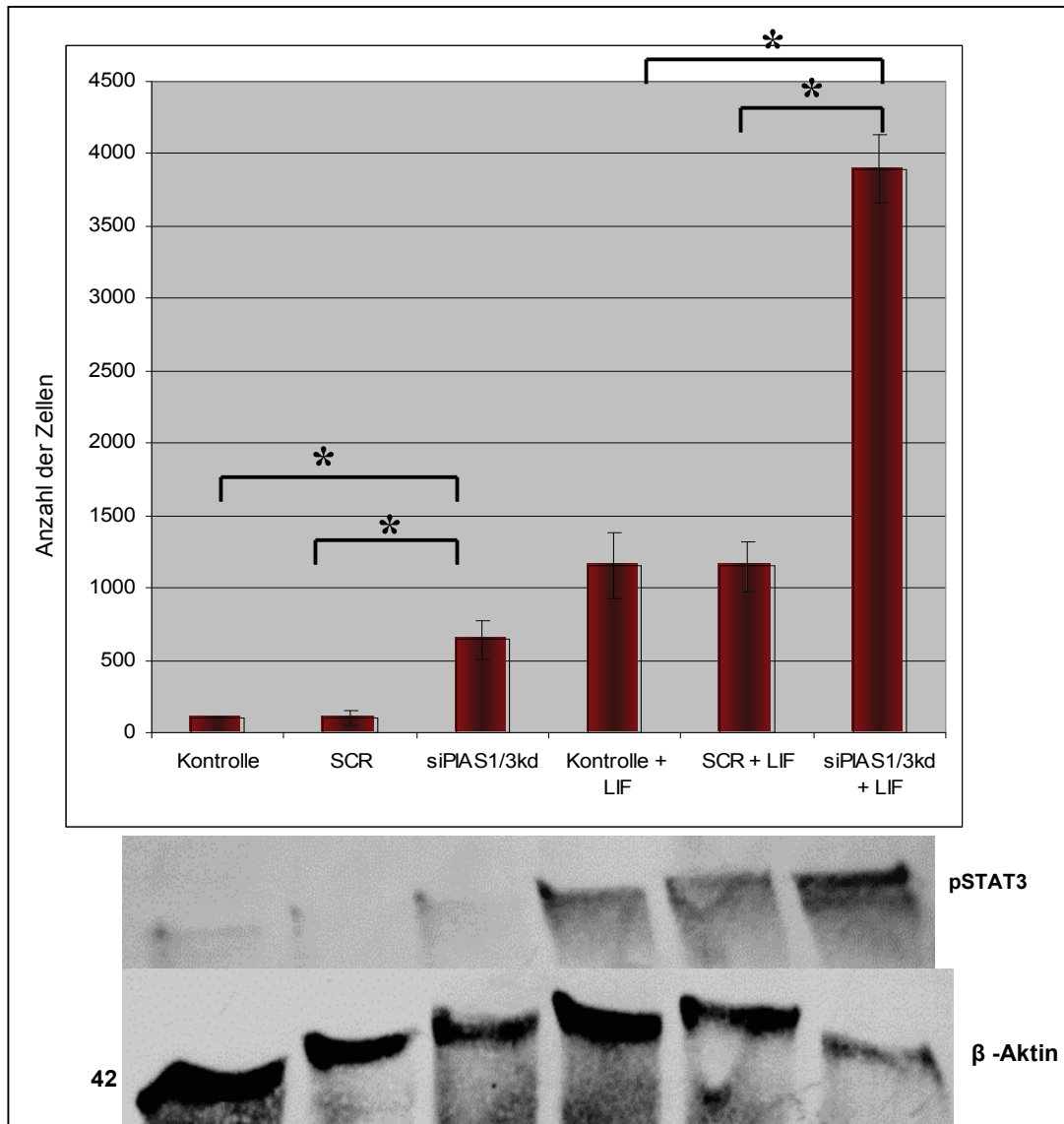
## 5.7 Der Einfluß des PIAS-„Knockdowns“ auf die Phosphorylierung von STAT3

In diesem Versuch sollte der Einfluss des Knockdowns von PIAS1 und PIAS3 auf die Tyrosin-Phosphorylierung und somit die Aktivierung von STAT3 untersucht werden. Dazu wurde die Expression von PIAS in JAR- Zellen durch die Transfektion mit siRNA unterdrückt. Um Einflüsse durch den Transfektionsvorgang auszuschließen,





wurde als Kontrolle eine Probe mit einer nicht-genomischen siRNA transfiziert. Anschließend wurden ein Phospho-STAT3-Nachweis, sowie ein  $\beta$ -Actin-Nachweis mittels SDS-PAGE und Western-blot durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass der „Knockdown“ von PIAS1 und PIAS3 den Phosphorylierungsgrad von STAT3, verglichen mit den Kontrollen, signifikant verstärkt (Abb. 5.9). In einem weiteren Experiment sollte der Einfluß der PIAS-Isoformen auf die durch LIF induzierte Tyrosinphosphorylierung von STAT3 in den transfizierten Zellen untersucht werden.



**Abb.5.10:** Western Blot und Quantifizierung der Bandenintensitäten für die Phosphorylierung von STAT3 48 Stunden nach der Transfektion mit PIAS1/3-siRNA und 20 Minuten LIF-Stimulation in JAR-Zellen im Vergleich zur Negativ- Kontrolle und einer nicht-genomischen Kontroll-Transfektion (SCR = "Scramled"-Kontrolle).  $\beta$ -Aktin diente als Auftragskontrolle. Dargestellt ist die relative Protein-Expression in Prozent (Kontrolle = 100%). Die Abbildung zeigt den jeweiligen Mittelwert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardfehler. (t-Test, \* $p < 0,05$ ),  $n = 3$  unabhängige Versuche.



Dazu wurden die JAR- Zellen mit PIAS1/3-siRNA und mit einer nicht-genomischen siRNA 48 Stunden transfiziert und nach der Transfektion mit LIF (10ng/ml) für 20 min stimuliert. Anschließend wurde die Expression von pSTAT3 mittels Western Blot analysiert.

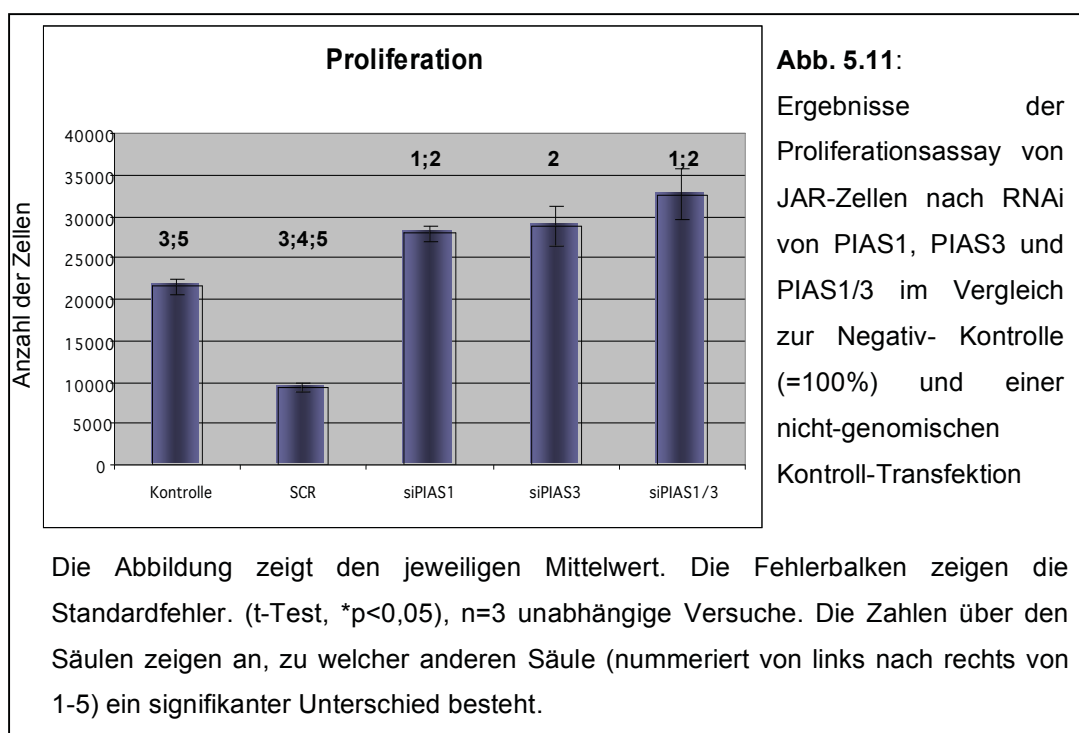
Hier konnte auch eine signifikante Erhöhung (\* $P < 0,05$ ) des Phospho-STAT3-Levels nach PIAS-„Knockdown“ nachgewiesen werden (Abb. 5.9).

## 5.8 Funktionelle Tests

Mit Hilfe funktioneller Tests sollte der Einfluss von PIAS1 und PIAS3 auf Proliferation und Invasion von JAR-Zellen untersucht werden. Es wurde erwartet, dass durch die verminderte Expression von PIAS Molekülen durch „RNA interference“ eine verstärkte STAT3 Aktivität (Phosphorylierung, DNA-Bindung), erhöhte Proliferation und Invasion beobachtet werden kann.

### 5.8.1 Der Einfluß des PIAS-„Knockdowns“ auf die Proliferation von JAR-Zellen

In diesem Experiment sollte untersucht werden, ob ein „Knock Down“ von PIAS1 und PIAS3 in JAR- Zellen deren Proliferation beeinflusst. Die Proliferation untransfizierter, Kontroll-siRNA-transfizierter, siPIAS1- und siPIAS3-transfizierter JAR-Zellen wurde in

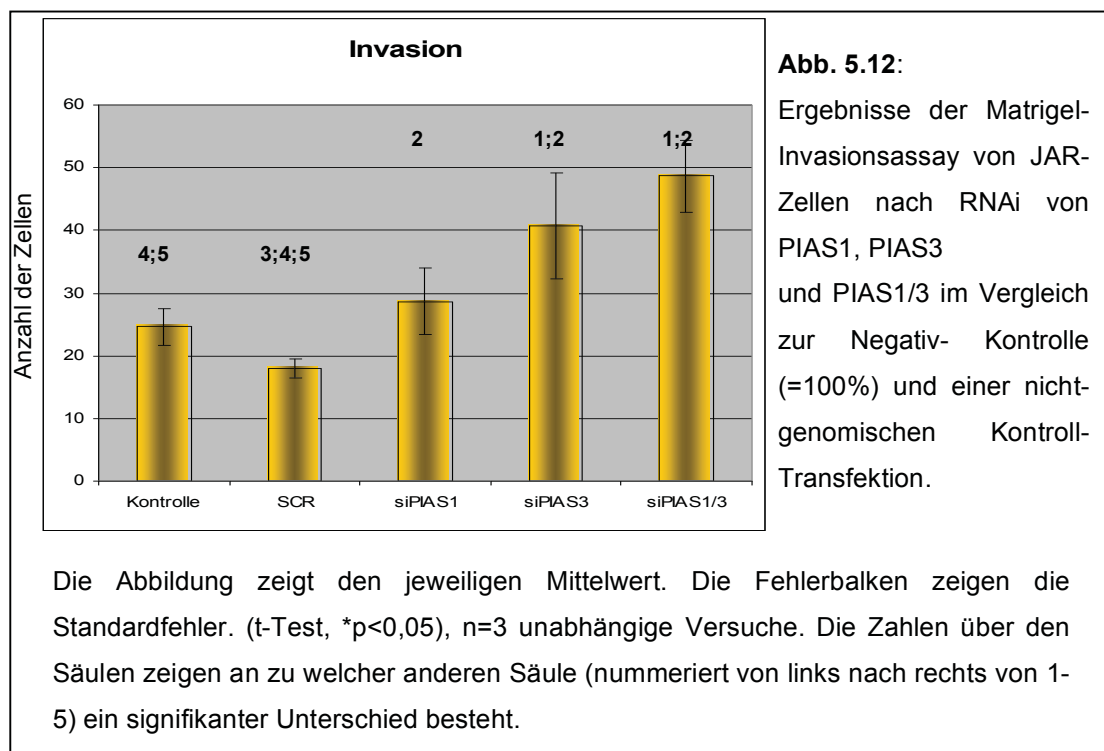


einem 24h-Assay untersucht. Dazu wurden jeweils 30000 Zellen eingesetzt.

Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Erhöhung (\* $P < 0,05$ ) der Proliferation bei si-PIAS1- und si-PIAS3-transfizierten Zellen im Vergleich mit untransfizierten Zellen und Zellen mit Kontroll-siRNA-Transfektion (Abb. 5.11).

### 5.8.2. Der Einfluß des PIAS-„Knockdowns“ auf die Invasion von JAR-Zellen

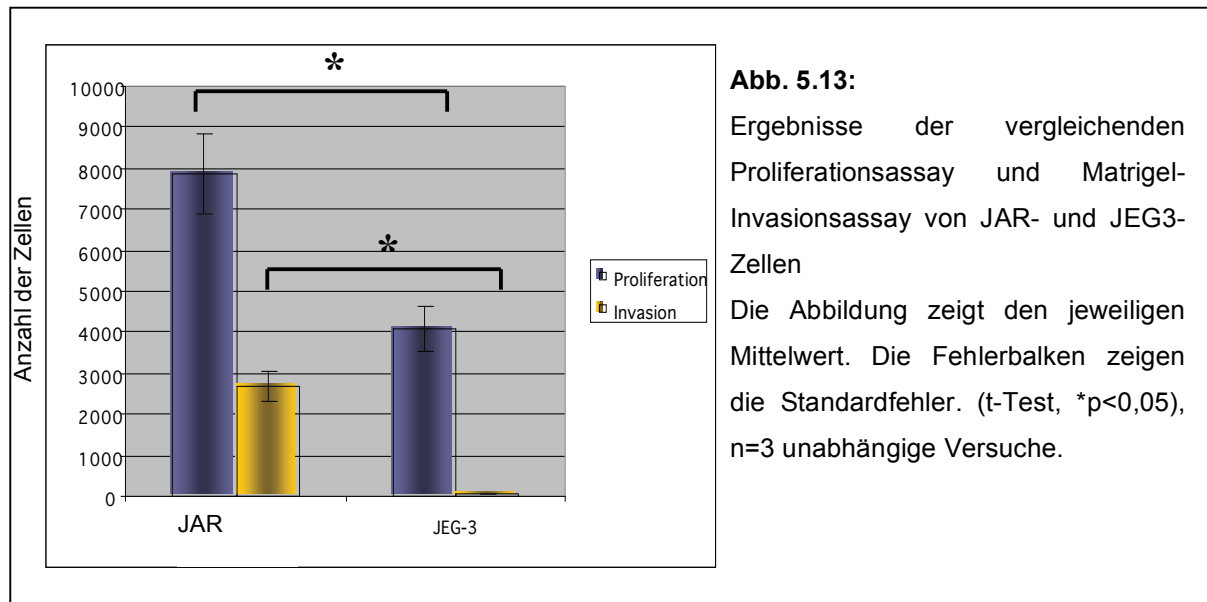
Weiterhin sollte der Einfluss von PIAS1- und PIAS3- „Knock Down“ auf die Invasion von JAR-Zellen untersucht werden. Dazu wurden JAR- Zellen mit Kontroll-siRNA, sowie mit PIAS1- und PIAS3-siRNA transfiziert und in Matrigel-Invasionsassays analysiert.



Hier wurde auch eine signifikante (\* $P < 0,05$ ) Erhöhung der Invasion nach PIAS1- und PIAS3- „Knock Down“ im Vergleich mit untransfizierten Zellen und Zellen mit Kontroll-siRNA-Transfektion festgestellt (Abb. 5.12).

## 5.9 JAR VS. JEG-3, funktionelle Tests

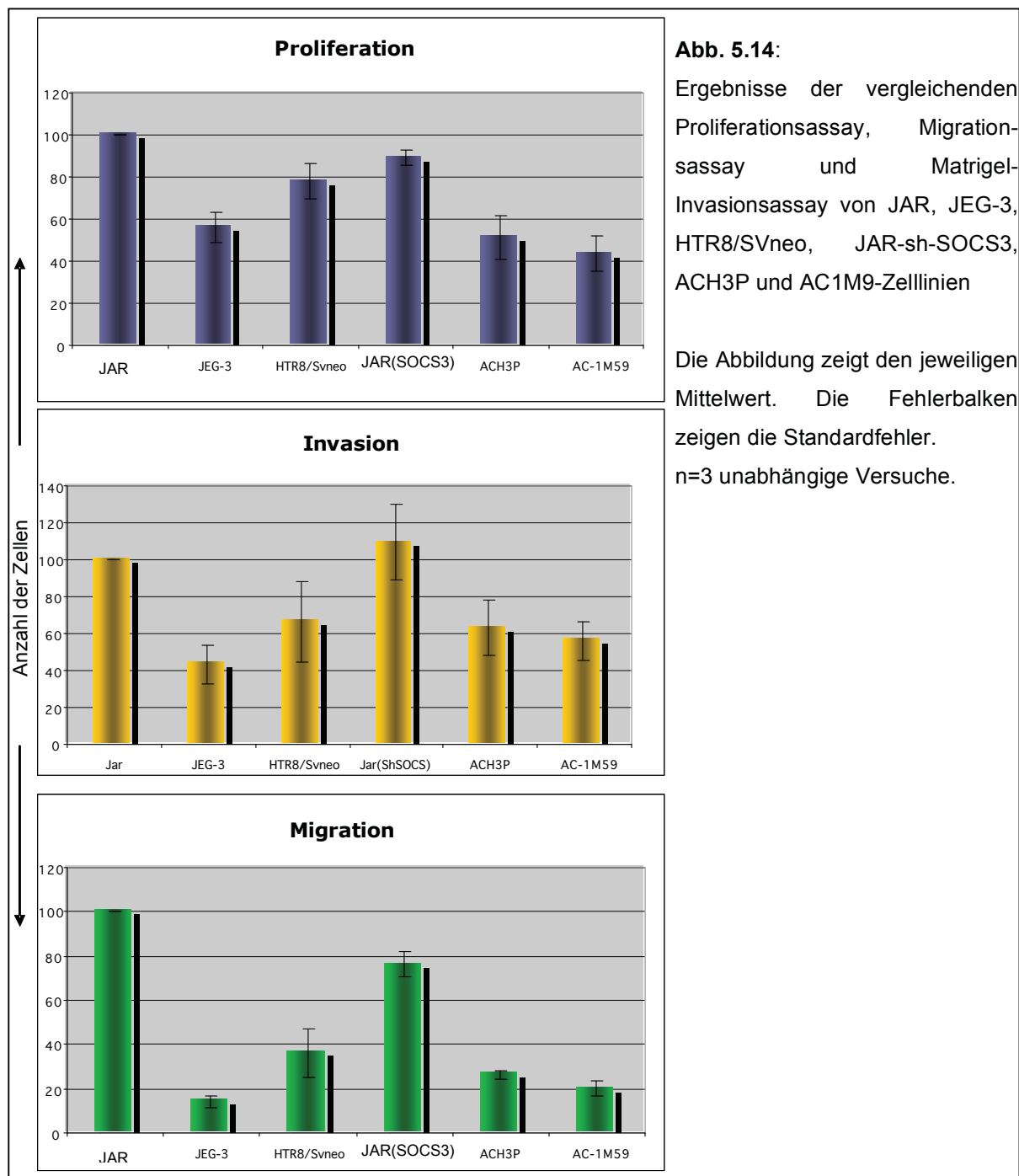
In einem weiteren Experiment wurden die Proliferation und Invasion von JEG3- und JAR-Zellen verglichen. Dazu wurden die JAR- und JEG-3-Zellen kultiviert und mittels 24h-Proliferationsassay und Matrigel-Invasionsassay analysiert



JAR-Zellen zeigten im Vergleich mit JEG-3-Zellen eine signifikant (\* $P < 0,05$ ) höhere Proliferation und Invasion (Abb. 5.13).

### 5.10. Proliferations-, Migrations- und Invasionsassay mit 6 Zelllinien

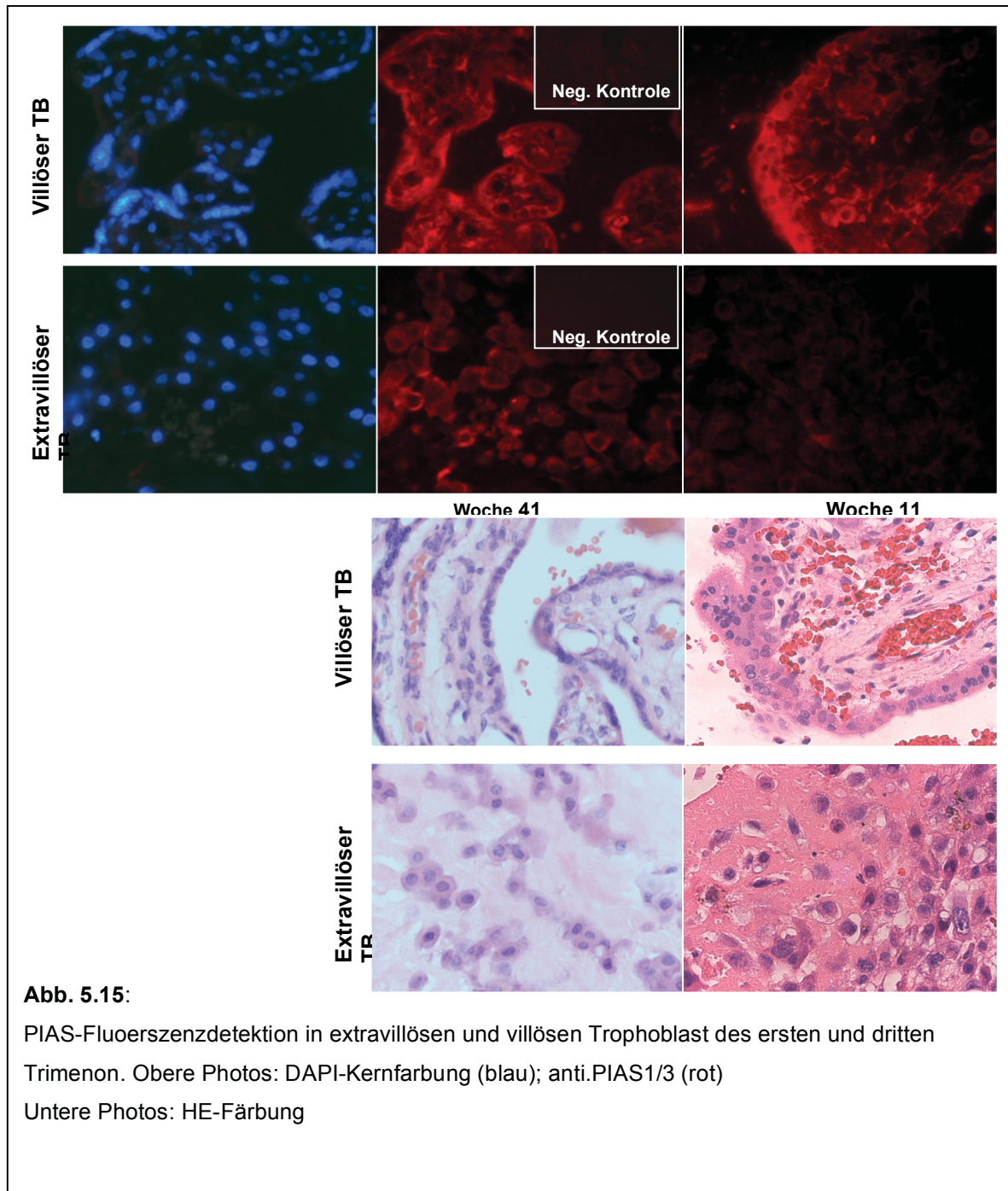
Als nächstes wurden Assays zur Analyse der Zellfunktion (Migrations-Assay, Proliferations-Assays, Invasions-Assays) bei 6 verschiedenen Zelllinien (JAR, JEG-3, HTR8/SVneo, JAR-sh-SOCS3, ACH3P und AC1M9) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen kultiviert und in oben genannten Assays analysiert.



Die Ergebnisse sprechen für eine erhöhte funktionelle Aktivität (Proliferation, Migration, Invasion) der Zelllinien JAR, HTR8/SVneo und JAR-sh-SOCS3 (Abb. 5.14).

### 5.11 Immunhistochemischer Nachweis der Lokalisation von PIAS in der Plazenta

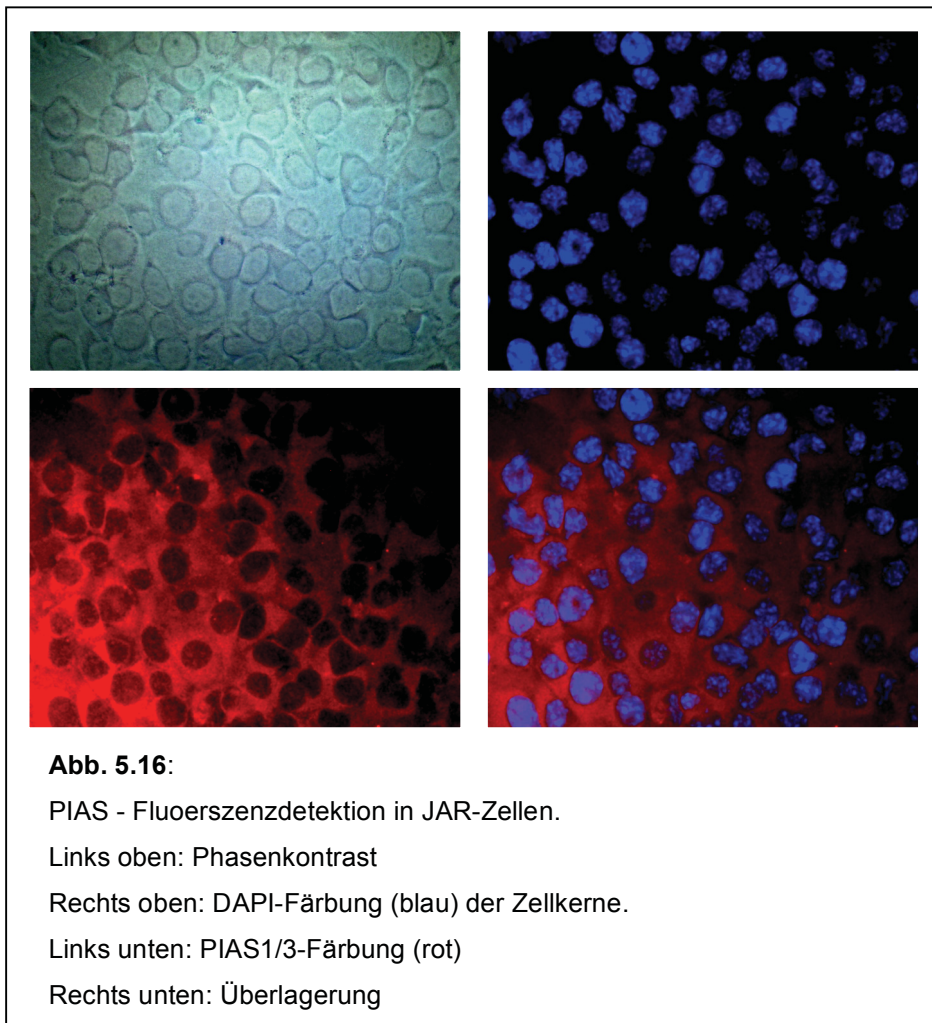
Die PIAS-Expression wurde im villösen und extravillösen Zytotrophoblast mittels Immunhistochemie analysiert.



Es wurde gezeigt, dass die PIAS-Expression im invasiven extravillösen Trophoblast des ersten Trimenons geringer ist als im villösen Trophoblast und im Trophoblast des dritten Trimenons (Abb. 5.15).

## 5.12 Immunzytochemischer Nachweis der Lokalisation von PIAS in JAR-Zellen

Weiterhin sollte die Lokalisierung von PIAS-Molekülen innerhalb unstimulierter JAR-Zellen durch die immunzytochemische Methode untersucht werden.

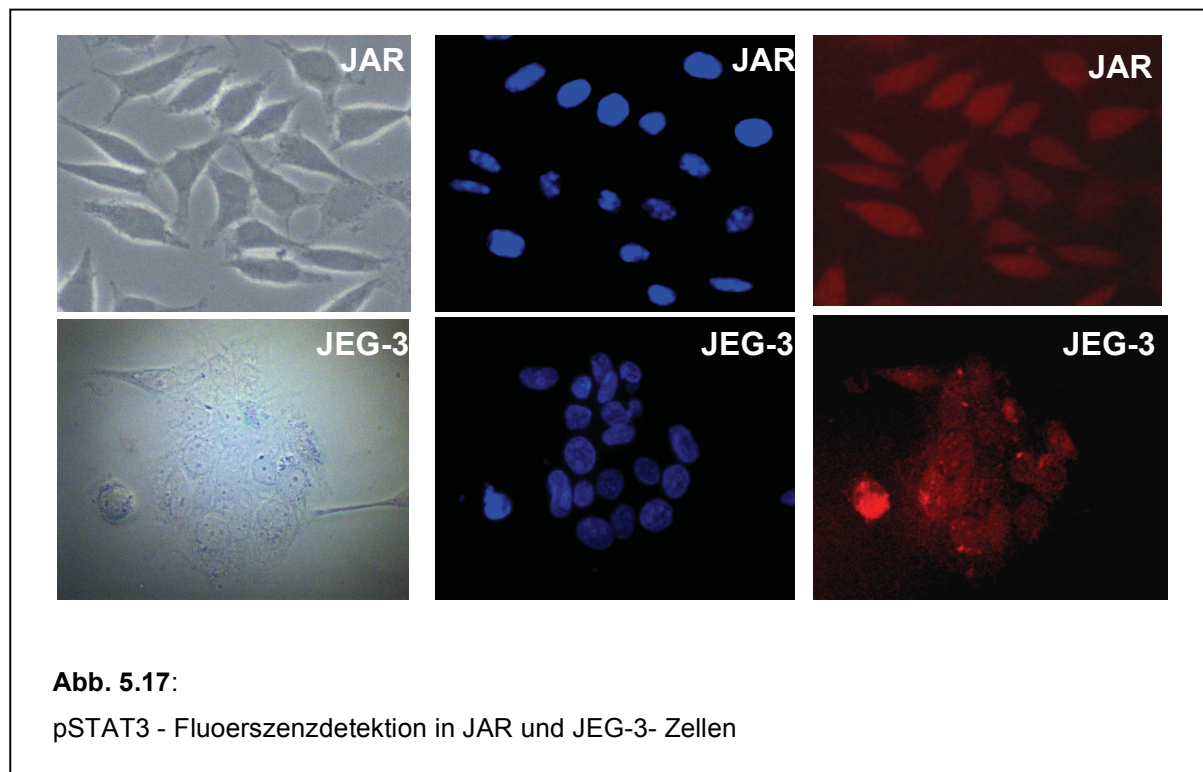


Es ließ sich eine deutliche zytoplasmatische Lokalisierung des PIAS-Signals in JAR-Zellen nachweisen (Abb. 5.16).



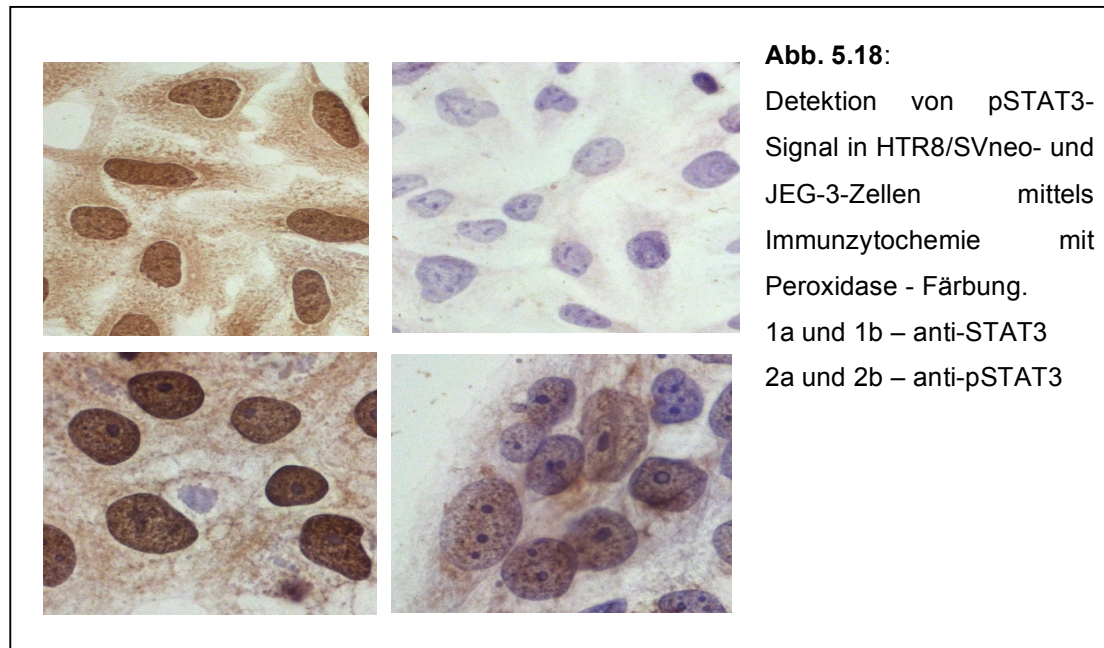
### 5.13 Vergleichsanalyse der Lokalisation von pSTAT3-Signal in in verschiedenen Zelllinien

In einem weiteren Experiment sollte eine Vergleichsanalyse der Lokalisation des pSTAT3-Signals in JAR- und JEG-3-Zellen durchgeführt werden.



In JEG-3 Zellen war das pSTAT3-Signal mehr kernbetont. Eine andere Lokalisation ließ sich in den JAR-Zellen beobachten, wo das Signal gleichmäßig zwischen dem Kern und dem Zytoplasma verteilt ist (Abb. 5.17).

Identische Ergebnisse wurden mittels Immunzytochemie mit Peroxidase-Färbung beim Vergleich von HTR8/SVneo und JEG-3-Zellen nachgewiesen. Hier konnte man auch ein kernbetontes pSTAT3-Signal in HTR8/SVneo -Zellen sehen, während in JEG-3-Zellen das Signal gleichmäßig zwischen dem Kern und dem Zytoplasma verteilt ist (Abb. 5.18).

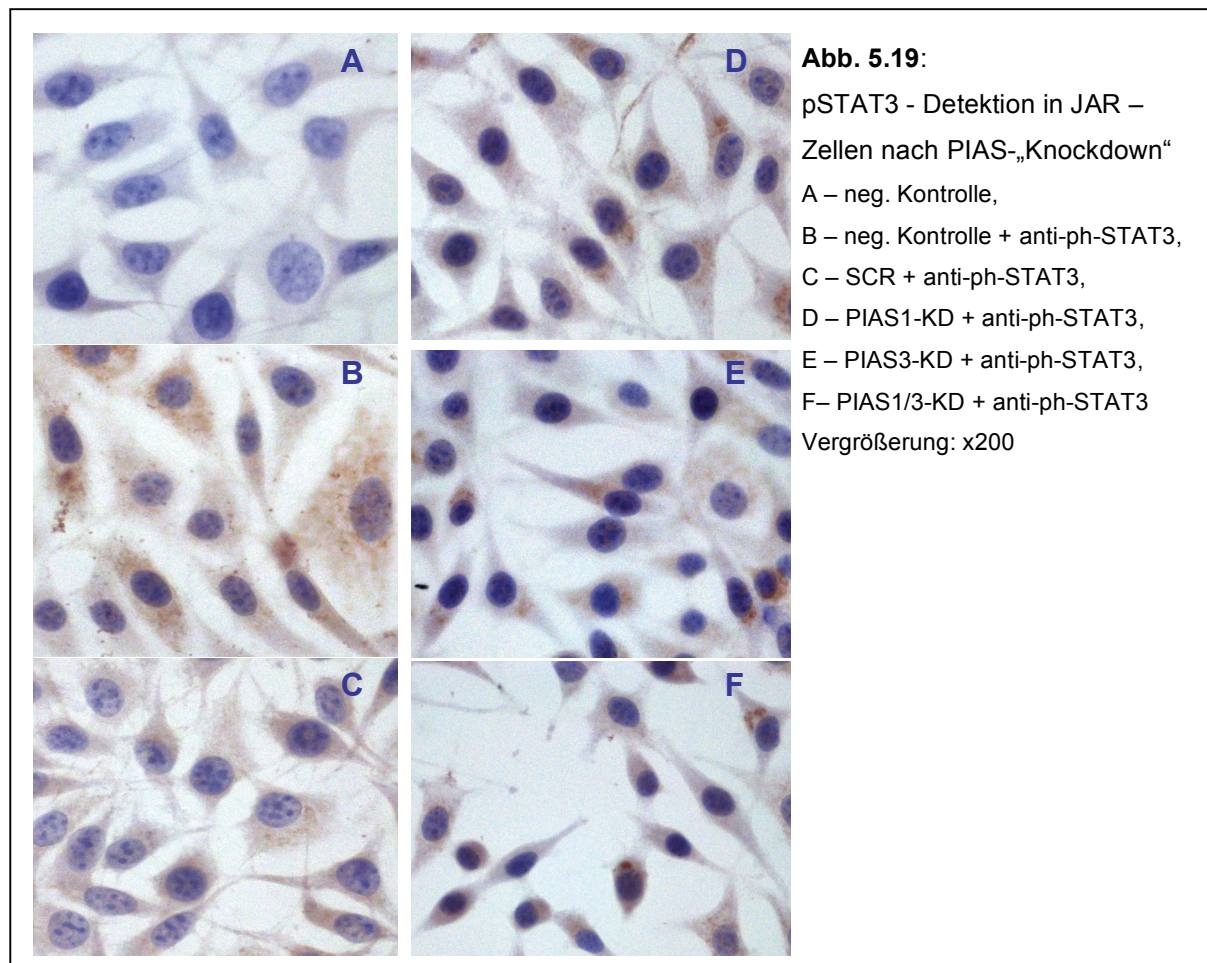


Da anti-STAT3-Antikörper sowohl die unphosphorylierte als auch die phosphorylierte Form von STAT3 erkennen, aber im Kern kein unphosphoryliertes STAT3-Signal zu erwarten ist, kann das detektierte STAT3 als pSTAT3 betrachtet werden.

### 5.15 Immunzytologische Analyse von pSTAT3-Signal in JAR- Zellen nach PIAS-„Knockdown“

In diesem Versuch sollte der Einfluss des PIAS-„Knockdowns“ auf die STAT-3-Aktivität bzw. die Lokalisation des ph-STAT3-Signals innerhalb der JAR-Zellen untersucht werden. Um die PIAS-Expression zu unterdrücken, wurden die JAR-Zellen mit si-PIAS1 und si-PIAS3 48h transfiziert. Danach wurden die transfizierten Zellen mittels Immunzytochemie mit Peroxidase-Färbung analysiert. Als Kontrollen wurden die nativen JAR-Zellen, mit und ohne Behandlung mit dem sekundären Antikörper, sowie eine mit einer nicht-genomischen siRNA transfizierte Probe verwendet.





Die Ergebnisse zeigten, dass die Unterdrückung der PIAS-Expression in JAR-Zellen zur Detektion eines gegenüber Kontroll-Proben verstärkten, pSTAT3-Signals in Zellkernen führt (Abb.5.19).

## 6. Diskussion

### Signaltransduktion in der Regulation der Zellfunktion

Die Nähe der physiologischen und stark-regulierten Charakteristik der Invasion vom Trophoblast und der deregulierten und pathologischen Invasivität ihrer malignen Derivate ist in den letzten Jahren im Fokus der wissenschaftlichen Aufmerksamkeit. Von besonderem Interesse sind die Kontrollmechanismen auf der Ebene der Signaltransduktion. Ein besseres Verständnis dieser Abläufe könnte zu neuen therapeutischen Möglichkeiten führen. In dieser Arbeit sollte die Rolle von PIAS in der negativen Regulation des JAK-STAT-Signalweges in trophoblastären Zellen untersucht werden.

### Die Bedeutung von STAT

STAT3 ist ein Schlüsselmolekül des JAK-STAT-Signalweges. Die onkogenen Eigenschaften von verschiedenen Tumorzellen sind durch die abnorme Expression und / oder Aktivierung dieses Proteins bedingt (Bowman T. et. al 2000). Es wurde gezeigt, dass STAT3, unter anderem für die Invasivität von menschlichen Trophoblastzellen und ihren malignen Derivaten, den Chorionkarzinom-Zellen, verantwortlich ist. Die konstitutive Expression und Aktivierung von STAT3 korreliert mit dem invasiven Potential dieser Zellen (Corvinus FM, Fitzgerald J 2003). Die Up-Regulierung von STAT3 in der JEG-3 Chorionkarzinom-Zelllinie durch Stimulierung mit LIF führt zu einem veränderten Protease-Profil, und letztlich zu einer erhöhten Proliferations- und Invasionsrate (Fitzgerald J. et al. 2005). Schließlich konnte nachgewiesen werden, dass durch die Wirkung eines STAT3-„Knock-down“ mittels siRNA ein Abfall der invasiven Kapazität in Trophoblast- und Chorionkarzinom-Zellen erreicht wurde, was durch eine weitere LIF-Stimulierung nur in geringem Maße wiederhergestellt werden kann (Poehlmann TG, Fitzgerald J. et al. 2006).

### Die negative Regulation des JAK/STAT-Weges

Heutzutage sind mehrere Mechanismen der negativen Regulation des JAK/STAT-Transduktionsweges bekannt. Der JAK/STAT-Transduktionsweg ist an verschiedenen Punkten kontrolliert, wodurch eine permanente Aktivierung und die Entstehung von Tumoren und anderen Krankheiten verhindert wird (Samuel Wormald and Douglas J. Hilton 2003). Von mehreren Autoren wurde die Rolle von SOCS an der Regulation der von LIF vermittelten STAT-Expression im Maus-Trophoblast untersucht (Isobe A et al. 2006; Boyle K et al. 2008). Die Rolle von PIAS in trophoblastären Zellen ist bisher nicht untersucht worden. PIAS, wie der Name andeutet, sind Proteine, die in der Lage sind, die Funktion von aktivierten STATs zu hemmen. Im Gegensatz zu SOCS werden die Mitglieder der PIAS-Familie konstitutiv exprimiert und dämpfen die Signaltransduktion durch die Blockierung der STAT-Aktivität (Shuai K et al. 2005).

### PIAS-Expression in verschiedenen Zellen und ihr funktionelles Verhalten

Der von uns durchgeführte immunhistochemische Nachweis von PIAS in der Plazenta zeigte, dass die PIAS-Expression im invasiven extravillösen Trophoblast des ersten Trimenons geringer ist als im villösen Trophoblast und im Trophoblast des dritten Trimenons. Das entspricht der unterschiedlichen Eigenschaften verschiedener Trophoblastzellen während der Trophoblastdifferenzierung und der unterschiedlichen STAT-Aktivität bzw. Trophoblast-Invasivität im Schwangerschaftsverlauf (Staun-Ram et al. 2005; Fitzgerald et al. 2005).

Der Unterschied oder das vollständige Fehlen der PIAS3-Expression in einer Reihe verschiedener trophoblastärer Zelllinien erregte unser Interesse in Hinblick auf ihr funktionelles Verhalten. In dieser Hinsicht sind die Unterschiede und Ähnlichkeiten zwischen den untersuchten Zelllinien interessant. Erstens, obwohl JEG-3 und JAR-Zellen beide aus menschlichen Chorionkarzinomzellen gewonnen wurden, ist es gut beschrieben, dass JAR-Zellen weniger differenziert sind und eine höhere Proliferations- und Invasionsrate als JEG-3-Zellen haben (Weiss et al. 2001; Grummer et al. 1994). Die Trophoblast-Hybrid-Zellen ACH-3P (erstes Trimester) und AC1-M59 (drittes Trimester) sind beide letztlich Ergebnisse von Fusionen mit JEG-3. Im Fall von ACH-3P, ist es eine Fusion zwischen AC1-1, einer Mutanten-Zelllinie von JEG-3 und Trophoblastzellen des ersten Trimenon, während AC1-M59 ein Subklon

von ACH1P ist, der durch eine somatische Hybridisierung von primären menschlichen Trophoblastzellen des dritten Trimesters mit AC1-1 etabliert wurde. Die Proliferationsrate von ACH-3P ist als stark beschrieben, während ihre Invasionsfähigkeiten vergleichbar mit denen der primären Trophoblasten des ersten Trimesters sind (Hiden et al. 2007).

HTR8/SVneo ist eine nicht-kanzerogene Zelllinie, die aus menschlichen extravillösen primären Erst-Trimester Trophoblastzellen isoliert und mit einem Plasmid transfiziert ist, welches ein „large T“-Antigen (TAG) vom „simian Virus 40 (SV40)“ enthält. Die in-vitro-invasive Kapazität von HTR8/SVneo Zellen wurde als ähnlich der von primären extravillösen Trophoblasten beschrieben. Im Gegensatz zu diesen ist jedoch, die HTR8/SVneo-Invasivität unempfindlich gegenüber TGF- $\beta$  (die Invasivität von extravillösen Trophoblasten wird in der Regel durch TGF- $\beta$  reduziert) (Graham et al. 1993).

PIAS1 Expression wurde in allen von uns untersuchten trophoblastären Zellen nachgewiesen. Durch die Untersuchung von PIAS1-„Knockout“-Mäusen konnte gezeigt werden, dass PIAS1 für die Entwicklung und die Funktion der Plazenta von Bedeutung ist (Liu B et al. 2004).

Der Nachweis von PIAS1 in allen untersuchten Zelllinien war somit zu erwarten. Eine ziemlich spannende Beobachtung ist jedoch, die unterschiedliche Expression oder das Fehlen von PIAS3 in manchen untersuchten Zelllinien.

Dies deutet darauf hin, dass PIAS3 ein Kandidat-Protein ist, das eine Schlüsselrolle in der Regulation und/oder Dysregulation der Funktion von Trophoblastzellen bzw. Chorionkarzinomen spielen könnte. In der Tat, eine PIAS3-Überexpression wurde in verschiedenen menschlichen Tumoren, wie z.B. Prostata, Lungen-, Brust-, Dickdarm- und Gehirntumoren, beschrieben und als möglicher molekularer Marker für diese Tumoren vorgeschlagen (Wang L. et al. 2004).

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass eine höhere Expression von PIAS3 mit einer höheren Invasivität korreliert. Das scheint entgegen den Erwartungen zu sein, da PIAS3 ein spezifischer Inhibitor von STAT3, also einem Promotor der Invasivität, ist. Der Vergleich der Liste der Tumoren, in denen STAT3 konstitutiv aktiv ist, zeigt eine Ähnlichkeit mit der Liste von Malignomen in denen PIAS3 ebenfalls übermäßig nachweisbar ist (Bowman et al 2000; Wang L. 2004). Bisherige Untersuchungen zeigen, dass STAT3 für die Regulierung der Lebensfähigkeit, Differenzierung, Proliferation und Migration der Zellen notwendig ist (Bromberg et al.

2001). Darüber hinaus ist bekannt, dass STAT3 konstitutiv in mehreren malignen Erkrankungen im Vergleich zu ihren physiologischen Derivaten erhöht exprimiert wird, und dass daher STAT3 als ein Onkogen betrachtet werden könnte (Bowman et al. 2000; Bromberg et al. 1999). Andere Studien zeigen, dass die STAT3-Aktivierung mit der Invasivität von Trophoblasten Zelllinien korreliert (Poehlmann et al. 2005; Fitzgerald et al. 2005).

Die DNA-Bindungs-Kapazität wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit nicht untersucht, aber die Tatsache, dass konstitutive STAT3 Expression in weniger invasiven Zelllinien (JEG-3) im Vergleich mit mehr invasiven Zelllinien (JAR) niedriger ist, stimmt mit oben genannten Studien überein.

Die negative Regulation durch PIAS3 erfolgt durch die spezifische Interaktion mit phosphoryliertem STAT. Die Blockierung der Transkription von Target-Proteinen erfolgt durch die Verhinderung der Dimerisierung der phosphorylierten STAT-Monomere oder möglicherweise durch Vermittlung der Dissoziation der aktiven STAT-Dimere, welche sowohl STAT3-STAT3 Homo- als auch STAT3-STAT1-Heterodimere sein können (Chung et al. 1997; Robyn Starr et al. 1999; Shuai and Liu, 2005). Unsere Vergleichsanalyse der Lokalisation des pSTAT3-Signals in verschiedenen Zelllinien mittels Immunzytochemie zeigte, dass ein kernbetontes pSTAT3-Signal bei den PIAS3-negativen Zelllinien nachzuweisen ist. Weitere Ergebnisse zeigten, dass die Unterdrückung der PIAS-Expression zur signifikanten Erhöhung der Proliferation und Invasion der Zellen und zur Detektion eines gegenüber Kontroll-Proben verstärkten pSTAT3-Signals in Zellkernen führt (Ein signifikant verstärkter Phosphorylierungsgrad von STAT3 nach PIAS-„Knockdown“ wurde auch mittels SDS-PAGE und Western-blot nachgewiesen).

In Anbetracht dessen ist es nicht unerwartet, dass PIAS3 in Zellen mit höherer STAT3-Aktivierung und STAT3-DNA-Bindungs-Aktivität, exprimiert wird, wie in früheren Studien an JAR-Zellen dokumentiert wurde (Corvinus et al. 2003). Außerdem, da PIAS wahrscheinlich nicht die Expression von STAT3 beeinflusst, ist es plausibel, dass durch hohe PIAS3-Expression, welche die Passage in den Zellkern inhibiert, STAT3 im Zytoplasma akkumuliert und daher verstärkt nachweisbar ist, wie es in unseren Ergebnissen zu sehen ist. Die Frage, warum die konstitutive STAT3-DNA-Bindungs-Aktivität in der JAR-Zelllinie trotz konstitutiver Expression von PIAS3 offenbar relativ stark ist, kann noch nicht beantwortet werden.

Dieses Dilemma provoziert die Überlegung, dass möglicherweise PIAS3 in diesen malignen Zellen dysfunktionell ist. In einer hepatozellulären Karzinom-Zelllinie wurde jedoch eine unveränderte Kapazität von PIAS3 nachgewiesen, die DNA-Bindungs-Fähigkeit von STAT3 zu unterdrücken (Herrmann A et al. 2007). Eine weitere unbeantwortete Frage ist, warum die PIAS3-Expression in JEG-3 Zellen und ihren Derivaten völlig ausbleibt, obwohl sie auch invasiv sind (wenn auch in geringerem Maße), STAT3 exprimieren und aktivieren.

Dagegen verhält sich interessanterweise die Expression von STAT1 umgekehrt, das heißt bei den von den JEG-3-Zellen abgeleiteten und PIAS3-negativen Zelllinien, ist das STAT1-Niveau höher. Es wurde berichtet, dass STAT1 eine hemmende Wirkung auf das Wachstum der Zellen haben kann und als ein Mediator für einen Tumor-Suppressor-Signalweg betrachtet werden kann (Bromberg J. et al. 2000). Allerdings zeigen viele Tumorarten eine Aktivierung von STAT1, 3 und 5 (Bromberg J. et al. 2001). Es ist auch denkbar, dass die STAT1-Expression mit dem Grad der Differenzierung der Zellen korreliert. Der Antagonismus von STAT1-Inhibitoren führt zu einer verstärkten Differenzierung. Dies entspricht der Beobachtung, dass die Abschaltung von SOCS3 in Trophoblastzellen bei Ratten zu einer erhöhten Differenzierung dieser Zellen führt (Takahashi Y. et al., 2003), weil SOCS3 ein negative Feedback-Protein für sowohl STAT1 als auch STAT3 ist.

Doch führt, zumindest in unseren Ergebnissen, ein permanenter SOCS3-„Knockdown“ in Zellen zu einer Senkung der STAT1-Expression, ohne Beeinträchtigung der PIAS1/3- und STAT3- Expression.

Eine weitere interessante Beobachtung ist, dass HTR8/SVneo, eine nicht-kanzerogene Zelllinie aus extravillösen Trophoblastzellen, ein ähnliches Expressions-Profil wie JAR-Zellen und ihre Derivate zeigt, während die Trophoblast-JEG-3-Hybride das Protein-Expressionsmuster von JEG-3 kopieren.



## Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit sollte die mögliche Rolle von PIAS-Molekülen in der negativen Regulation der Funktion von trophoblastären Zellen untersucht werden. Zuerst wurden 6 verschiedene Zelllinien und primäre isolierte Trophoblastzellen auf die Expression von 2 PIAS-Isoformen untersucht und im Bezug auf ihr funktionelles Verhalten verglichen. Als nächstes wurde mittels RNA-Interferenz ein effizienter „Knockdown“ von PIAS etabliert. Weiterhin sollte durch funktionelle Analysen der Einfluss von PIAS bzw. dessen „Knockdown“ auf die Proliferation, Migration und Invasion von Zellen untersucht werden. Anschließend sollte die Lokalisation von PIAS und pSTAT3 in Plazenta und verschiedenen Zelllinien mittels immunhisto- und immunzytochemischer Analyse nachgewiesen werden.

Die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit lassen folgende Schlüsse bezüglich der Funktion von PIAS zu:

- PIAS wird im wenig invasiven villösen Trophoblast und im Trophoblast des dritten Trimenons mehr exprimiert, als im invasiven extravillösen Trophoblast des ersten Trimenons.
- Eine Reihe von Chorionkarzinom- und Trophoblast-Zelllinien (JAR, JAR-SOCS3-shRNA, HTR8/SVneo) exprimieren beide PIAS-Isoformen (PIAS1 und PIAS3), während bei den anderen Zelllinien (JEG-3, ACH3P, AC1M59) und bei primären isolierten Trophoblastzellen nur PIAS1 nachzuweisen ist. Überraschenderweise zeigen die PIAS3-positive Zelllinien ein höheres Proliferations- und Invasions-Verhalten. Daraufhin könnte PIAS3 als möglicher molekularer Marker für die Invasivität der Zellen betrachtet werden.
- Andererseits führt „Knockdown“ von PIAS zu einer weiter verstärkten STAT3-Phosphorylierung und zu einem verstärkten pSTAT3-Signal in Zellkernen. Außerdem werden auch STAT3-induzierte Funktionen wie Proliferation, Migration und Invasion verstärkt.
- In PIAS3-positiven Zellen lässt sich ein kernbetontes pSTAT3-Signal nachweisen, während in PIAS3-negativen Zellen das Signal gleichmäßig zwischen dem Kern und dem Zytoplasma verteilt ist.

Das bessere Verstehen der Eigenschaften von PIAS könnte zu einem besseren Verständnis der Entstehung und Ausbreitung von Tumoren beitragen. Da die Plazenta als ein physiologisches Tumormodell betrachtet werden kann, ist es von großer Bedeutung diese Mechanismen in der Plazenta zu verstehen. Außerdem sind die molekularen Mechanismen für das Auftreten von den Komplikationen in der Schwangerschaft wie Präeklampsie, Intrauterine Wachstumsretardierung, Molenbildung sowie Choriokarzinomen noch weitgehend unklar. Darauf hin sind weitere funktionelle Experimente mit primären isolierten Trophoblastzellen sehr sinnvoll. Zukünftige Forschungen sollen dazu dienen, die Behandlungsstrategien von den durch PIAS kontrollierte Signalkaskaden gesteuerten menschlichen Schwangerschaftsstörungen sowie Krebs- und Immunerkrankungen zu verbessern.



## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Weges der Eizelle vom Eierstock über den Eileiter zur Einnistungstelle in der Gebärmutter  
([http://www.julius-ecke.de/bilder/Anatomie/80\\_Zellen/Befruchtung\\_Eizelle\\_Zellstadien.jpg](http://www.julius-ecke.de/bilder/Anatomie/80_Zellen/Befruchtung_Eizelle_Zellstadien.jpg))
- Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Implantation der Blastozyste (Fitzgerald et al. 2007)
- Abb.2.4: Trophoblastdifferenzierung (Pollheimer et al. 2005)
- Abb.2.5: Modulation der Spiralarterie. (Pollheimer et al. 2005)
- Abb.2.6: Schematische Darstellung der JAK/STAT Signalkaskade (A) und dessen negativen Regulation (B) (Wormald et al., 2003).
- Abb. 2.7: Struktur der PIAS-Proteine (Shuai et al. 2005)
- Abb.2.8: Mechanismen der PIAS-vermittelten Genregulation (Shuai et al. 2005)
- Abb. 4.3: Schematische Darstellung der RNA-Interferenz  
([http://www.nature.com/horizon/rna/highlights/figures/s4\\_spec2\\_f2.html](http://www.nature.com/horizon/rna/highlights/figures/s4_spec2_f2.html))
- Abb 4.4. Schematische Darstellung der SDS-Polyacrylamid-Gel-elektrophorese  
([http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics\\_WEB/proteins\\_purification.html](http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/proteins_purification.html))

Bei allen nicht aufgeführten Abbildungen handelt es sich um eigene Fotos oder Darstellungen.

## Literaturverzeichnis

- Adams AP, Antczak DF. 2001. Ectopic transplantation of equine invasive trophoblast. *Biol Reprod*, 64 (3):753-763.
- Adolf GR. 1987. Antigenic structure of human interferon omega 1 (interferon alpha II1): comparison with other human interferons. *J Gen Virol*, 68 ( Pt 6):1669-1676.
- Aglietta M, Monzeglio C, Pasquino P, Carnino F, Stern AC, Gavosto F. 1993. Short-term administration of granulocyte-macrophage colony stimulating factor decreases hematopoietic toxicity of cytostatic drugs. *Cancer*, 72 (10):2970-2973.
- Akira S, Taga T, Kishimoto T. 1993. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol*, 54:1-78.
- Akira S. 1999. Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem Cells*, 17 (3):138-146.
- Alberts J, Lewis, Raff, Roberts, Walter. 2004. *Molekularbiologie der Zelle*, (4. Auflage)
- Aplin JD. 1991. Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro. *J Cell Sci*, 99 ( Pt 4):681-692.
- Armstrong DT, Chaouat G. 1989. Effects of lymphokines and immune complexes on murine placental cell growth in vitro. *Biol Reprod*, 40 (3):466-474.
- Arora T, Liu B, He H, Kim J, Murphy TL, Murphy KM, Modlin RL, Shuai K. 2003. PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4. *J Biol Chem*, 278 (24):21327-21330.
- Athanassakis I, Bleackley RC, Paetkau V, Guilbert L, Barr PJ, Wegmann TG. 1987. The immunostimulatory effect of T cells and T cell lymphokines on murine fetally derived placental cells. *J Immunol*, 138 (1):37-44.
- Banville D, Stocco R, Shen SH. 1995. Human protein tyrosine phosphatase 1C (PTPN6) gene structure: alternate promoter usage and exon skipping generate multiple transcripts. *Genomics*, 27 (1):165-173.
- Baron D. 1990. [Monoclonal antibodies and mediators--immunologic tumor therapy]. *Naturwissenschaften*, 77 (9):405-411.
- Barth A, Morton DL. 1995. The role of adjuvant therapy in melanoma management. *Cancer*, 75 (2 Suppl):726-734.
- Bauernhofer T, Stoger H, Schmid M, Smola M, Gurtl-Lackner B, Hofler G, Ranner G, Reisinger E, Samonigg H. 1996. Sequential treatment of recurrent mesenteric desmoid tumor. *Cancer*, 77 (6):1061-1065.

- Begitt A, Meyer T, van Rossum M, Vinkemeier U. 2000. Nucleocytoplasmic translocation of Stat1 is regulated by a leucine-rich export signal in the coiled-coil domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (19):10418-10423.
- Bersinger NA, Wunder D, Vanderlick F, Chanson A, Pescia G, Janecek P, Boillat E, Birkhauser MH. 2004. Maternal serum levels of placental proteins after in vitro fertilisation and their implications for prenatal screening. *Prenat Diagn*, 24 (6):471-477.
- Bersinger NA, Odegard RA. 2004. Second- and third-trimester serum levels of placental proteins in preeclampsia and small-for-gestational age pregnancies. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 83 (1):37-45.
- Betz A, Lampen N, Martinek S, Young MW, Darnell JE, Jr. 2001. A Drosophila PIAS homologue negatively regulates stat92E. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (17):9563-9568.
- Bhatt H, Brunet LJ, Stewart CL. 1991. Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (24):11408-11412.
- Bilinski P, Roopenian D, Gossler A. 1998. Maternal IL-11Ralpha function is required for normal decidua and fetoplacental development in mice. *Genes Dev*, 12 (14):2234-2243.
- Bischof P, Haenggeli L, Campana A. 1995. Effect of leukemia inhibitory factor on human cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway. *Am J Reprod Immunol*, 34 (4):225-230.
- Bischof P, Campana A. 2000. A putative role for oncogenes in trophoblast invasion? *Hum Reprod*, 15 Suppl 6:51-58.
- Bischof P, Irminger-Finger I. 2005. The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon. *Int J Biochem Cell Biol*, 37 (1):1-16.
- Blaschitz A, Juch H, Volz A, Hutter H, Daxboeck C, Desoye G, Dohr G. 2005. The soluble pool of HLA-G produced by human trophoblasts does not include detectable levels of the intron 4-containing HLA-G5 and HLA-G6 isoforms. *Mol Hum Reprod*, 11 (10):699-710.
- Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*, 15:749-795.
- Bonini JA, Colca J, Hofmann C. 1995. Altered expression of insulin signaling components in streptozotocin-treated rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 212 (3):933-938.

- Borghouts C, Tittmann H, Delis N, Kirchenbauer M, Brill B, Groner B. The intracellular delivery of a recombinant peptide derived from the acidic domain of PIAS3 inhibits STAT3 transactivation and induces tumor cell death. *Mol Cancer Res*, 8 (4):539-553.
- Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. 2000. STATs in oncogenesis. *Oncogene*, 19 (21):2474-2488.
- Boyle K, Egan P, Rakar S, Willson TA, Wicks IP, Metcalf D, Hilton DJ, Nicola NA, Alexander WS, Roberts AW, Robb L. 2007. The SOCS box of suppressor of cytokine signaling-3 contributes to the control of G-CSF responsiveness in vivo. *Blood*, 110 (5):1466-1474.
- Boyle K, Robb L. 2008. The role of SOCS3 in modulating leukaemia inhibitory factor signalling during murine placental development. *J Reprod Immunol*, 77 (1):1-6.
- Brantley EC, Nabors LB, Gillespie GY, Choi YH, Palmer CA, Harrison K, Roarty K, Benveniste EN. 2008. Loss of protein inhibitors of activated STAT-3 expression in glioblastoma multiforme tumors: implications for STAT-3 activation and gene expression. *Clin Cancer Res*, 14 (15):4694-4704.
- Briscoe J, Guschin D, Muller M. 1994. Signal transduction. Just another signalling pathway. *Curr Biol*, 4 (11):1033-1035.
- Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE, Jr. 1999. Stat3 as an oncogene. *Cell*, 98 (3):295-303.
- Bromberg J, Darnell JE, Jr. 2000. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene*, 19 (21):2468-2473.
- Bromberg JF. 2001. Activation of STAT proteins and growth control. *Bioessays*, 23 (2):161-169.
- Burrows TD, King A, Loke YW. 1993. Expression of integrins by human trophoblast and differential adhesion to laminin or fibronectin. *Hum Reprod*, 8 (3):475-484.
- Burrows TD, King A, Loke YW. 1996. Trophoblast migration during human placental implantation. *Hum Reprod Update*, 2 (4):307-321.
- Butterworth BE, Earle LL, Strom S, Jirtle R, Michalopoulos G. 1983. Induction of DNA repair in human and rat hepatocytes by 1,6-dinitropyrene. *Mutat Res*, 122 (1):73-80.
- Caldenhoven E, van Dijk TB, Solari R, Armstrong J, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L, de Groot RP. 1996. STAT3beta, a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription. *J Biol Chem*, 271 (22):13221-13227.

- Caldenhoven E, van Dijk TB, Solari R, Armstrong J, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L, de Groot RP. 1996. STAT3beta, a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription. *J Biol Chem*, 271 (22):13221-13227.
- Catalano RD, Johnson MH, Campbell EA, Charnock-Jones DS, Smith SK, Sharkey AM. 2005. Inhibition of Stat3 activation in the endometrium prevents implantation: a nonsteroidal approach to contraception. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (24):8585-8590.
- Chaouat G, Menu E, Clark DA, Dy M, Minkowski M, Wegmann TG. 1990. Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy. *J Reprod Fertil*, 89 (2):447-458.
- Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL. 2004. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol*, 173 (2):945-954.
- Chen BD, Chou TH, Ratanatharathorn V. 1987. Expression of gamma-interferon receptor in murine bone marrow-derived macrophages associated with macrophage differentiation: evidence of gamma-interferon receptors in the regulation of macrophage proliferation. *J Cell Physiol*, 133 (2):313-320.
- Cheng JG, Rodriguez CI, Stewart CL. 2002. Control of uterine receptivity and embryo implantation by steroid hormone regulation of LIF production and LIF receptor activity: towards a molecular understanding of "the window of implantation". *Rev Endocr Metab Disord*, 3 (2):119-126.
- Chim CS, Fung TK, Cheung WC, Liang R, Kwong YL. 2004. SOCS1 and SHP1 hypermethylation in multiple myeloma: implications for epigenetic activation of the Jak/STAT pathway. *Blood*, 103 (12):4630-4635.
- Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K. 1997. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science*, 278 (5344):1803-1805.
- Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K. 1997. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science*, 278 (5344):1803-1805.
- Clevenger CV. 2004. Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer. *Am J Pathol*, 165 (5):1449-1460.
- Corvinus FM, Fitzgerald JS, Friedrich K, Markert UR. 2003. Evidence for a correlation between trophoblast invasiveness and STAT3 activity. *Am J Reprod Immunol*, 50 (4):316-321.

- Crosier KE, Wong GG, Mathey-Prevot B, Nathan DG, Sieff CA. 1991. A functional isoform of the human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor receptor has an unusual cytoplasmic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (17):7744-7748.
- Cullinan EB, Abbondanzo SJ, Anderson PS, Pollard JW, Lessey BA, Stewart CL. 1996. Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (7):3115-3120.
- Dabir S, Kluge A, Dowlati A. 2009. The association and nuclear translocation of the PIAS3-STAT3 complex is ligand and time dependent. *Mol Cancer Res*, 7 (11):1854-1860.
- Damsky CH, Librach C, Lim KH, Fitzgerald ML, McMaster MT, Janatpour M, Zhou Y, Logan SK, Fisher SJ. 1994. Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development*, 120 (12):3657-3666.
- Damsky CH, Fisher SJ. 1998. Trophoblast pseudo-vasculogenesis: faking it with endothelial adhesion receptors. *Curr Opin Cell Biol*, 10 (5):660-666.
- Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR. 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, 264 (5164):1415-1421.
- Darnell JE, Jr. 1997. STATs and gene regulation. *Science*, 277 (5332):1630-1635.
- Das C, Kumar VS, Gupta S, Kumar S. 2002. Network of cytokines, integrins and hormones in human trophoblast cells. *J Reprod Immunol*, 53 (1-2):257-268.
- Dash PR, Whitley GS, Ayling LJ, Johnstone AP, Cartwright JE. 2005. Trophoblast apoptosis is inhibited by hepatocyte growth factor through the Akt and beta-catenin mediated up-regulation of inducible nitric oxide synthase. *Cell Signal*, 17 (5):571-580.
- David M, Chen HE, Goelz S, Lerner AC, Neel BG. 1995. Differential regulation of the alpha/beta interferon-stimulated Jak/Stat pathway by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. *Mol Cell Biol*, 15 (12):7050-7058.
- Demetri GD, Griffin JD. 1991. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood*, 78 (11):2791-2808.
- Dimitriadis E, Salamonsen LA, Robb L. 2000. Expression of interleukin-11 during the human menstrual cycle: coincidence with stromal cell decidualization and relationship to leukaemia inhibitory factor and prolactin. *Mol Hum Reprod*, 6 (10):907-914.

- Dimitriadis E, Stoikos C, Stafford-Bell M, Clark I, Paiva P, Kovacs G, Salamonsen LA. 2006. Interleukin-11, IL-11 receptoralpha and leukemia inhibitory factor are dysregulated in endometrium of infertile women with endometriosis during the implantation window. *J Reprod Immunol*, 69 (1):53-64.
- Dimitriadis E, Stoikos C, Tan YL, Salamonsen LA. 2006. Interleukin 11 signaling components signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) regulate human endometrial stromal cell differentiation. *Endocrinology*, 147 (8):3809-3817.
- Docke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, Volk HD, Kox W. 1997. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med*, 3 (6):678-681.
- Dokras A, Gardner LM, Seftor EA, Hendrix MJ. 2001. Regulation of human cytotrophoblast morphogenesis by hepatocyte growth factor/scatter factor. *Biol Reprod*, 65 (4):1278-1288.
- Duechting A, Tschope C, Kaiser H, Lamkemeyer T, Tanaka N, Aberle S, Lang F, Torresi J, Kandolf R, Bock CT. 2008. Human parvovirus B19 NS1 protein modulates inflammatory signaling by activation of STAT3/PIAS3 in human endothelial cells. *J Virol*, 82 (16):7942-7952.
- Duval D, Duval G, Kedingier C, Poch O, Boeuf H. 2003. The 'PINIT' motif, of a newly identified conserved domain of the PIAS protein family, is essential for nuclear retention of PIAS3L. *FEBS Lett*, 554 (1-2):111-118.
- Ehrmann J, Strakova N, Vrzalikova K, Hezova R, Kolar Z. 2008. Expression of STATs and their inhibitors SOCS and PIAS in brain tumors. In vitro and in vivo study. *Neoplasma*, 55 (6):482-487.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411 (6836):494-498.
- Feinberg BB, Gonik B. 1991. General precepts of the immunology of pregnancy. *Clin Obstet Gynecol*, 34 (1):3-16.
- Feinberg K. 1992. Trophoblast Differentiation. *The First Twelve Weeks of Gestation*, (1. Auflage):3-25.
- Finkelman FD, Katona IM, Mosmann TR, Coffman RL. 1988. IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J Immunol*, 140 (4):1022-1027.
- Fischer P, Lehmann U, Sobota RM, Schmitz J, Niemand C, Linnemann S, Haan S, Behrmann I, Yoshimura A, Johnston JA, Muller-Newen G, Heinrich PC, Schaper



- F. 2004. The role of the inhibitors of interleukin-6 signal transduction SHP2 and SOCS3 for desensitization of interleukin-6 signalling. *Biochem J*, 378 (Pt 2):449-460.
- Fitzgerald JS, Tsareva SA, Poehlmann TG, Berod L, Meissner A, Corvinus FM, Wiederanders B, Pfitzner E, Markert UR, Friedrich K. 2005. Leukemia inhibitory factor triggers activation of signal transducer and activator of transcription 3, proliferation, invasiveness, and altered protease expression in choriocarcinoma cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 37 (11):2284-2296.
- Fitzgerald JS, Busch S, Wengenmayer T, Foerster K, de la Motte T, Poehlmann TG, Markert UR. 2005. Signal transduction in trophoblast invasion. *Chem Immunol Allergy*, 88:181-199.
- Fitzgerald JS, Poehlmann TG, Schleussner E, Markert UR. 2008. Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *Hum Reprod Update*, 14 (4):335-344.
- Freundlich B, Jimenez SA, Steen VD, Medsger TA, Jr., Szkolnicki M, Jaffe HS. 1992. Treatment of systemic sclerosis with recombinant interferon-gamma. A phase I/II clinical trial. *Arthritis Rheum*, 35 (10):1134-1142.
- Garbisa S, Onisto M, Mazzanti L, Tranquilli AL, Pagnaloni A, Biagini G, Cester N, Romanini C. 1993. Cultured human trophoblast cells reproduce the initial events of placental biology. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 20 (4):207-215.
- Garcia R, Bowman TL, Niu G, Yu H, Minton S, Muro-Cacho CA, Cox CE, Falcone R, Fairclough R, Parsons S, Laudano A, Gazit A, Levitzki A, Kraker A, Jove R. 2001. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene*, 20 (20):2499-2513.
- Gearing DP, Gough NM, King JA, Hilton DJ, Nicola NA, Simpson RJ, Nice EC, Kelso A, Metcalf D. 1987. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *EMBO J*, 6 (13):3995-4002.
- George PM, Lorier MA, Donaldson IM. 1983. An evaluation of cerebrospinal fluid oligoclonal banding confirmed by immunofixation on agarose gel. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 46 (6):500-504.
- Gerhartz HH, Stern AC, Wolf-Hornung B, Kazempour M, Schmetzer H, Gugerli U, Jones TC, Wilmanns W. 1993. Intervention treatment of established neutropenia with human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF) in patients undergoing cancer chemotherapy. *Leuk Res*, 17 (2):175-185.



- Giacomini G, Tabibzadeh SS, Satyaswaroop PG, Bonsi L, Vitale L, Bagnara GP, Strippoli P, Jasonni VM. 1995. Epithelial cells are the major source of biologically active granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human endometrium. *Hum Reprod*, 10 (12):3259-3263.
- Gough NM, Gough J, Metcalf D, Kelso A, Grail D, Nicola NA, Burgess AW, Dunn AR. 1984. Molecular cloning of cDNA encoding a murine haematopoietic growth regulator, granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Nature*, 309 (5971):763-767.
- Graham CH, Hawley TS, Hawley RG, MacDougall JR, Kerbel RS, Khoo N, Lala PK. 1993. Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Exp Cell Res*, 206 (2):204-211.
- Greenhalgh CJ, Hilton DJ. 2001. Negative regulation of cytokine signaling. *J Leukoc Biol*, 70 (3):348-356.
- Gross M, Liu B, Tan J, French FS, Carey M, Shuai K. 2001. Distinct effects of PIAS proteins on androgen-mediated gene activation in prostate cancer cells. *Oncogene*, 20 (29):3880-3887.
- Gross M, Yang R, Top I, Gasper C, Shuai K. 2004. PIASy-mediated repression of the androgen receptor is independent of sumoylation. *Oncogene*, 23 (17):3059-3066.
- Grummer R, Hohn HP, Mareel MM, Denker HW. 1994. Adhesion and invasion of three human choriocarcinoma cell lines into human endometrium in a three-dimensional organ culture system. *Placenta*, 15 (4):411-429.
- Gupta AK, Rusterholz C, Huppertz B, Malek A, Schneider H, Holzgreve W, Hahn S. 2005. A comparative study of the effect of three different syncytiotrophoblast micro-particles preparations on endothelial cells. *Placenta*, 26 (1):59-66.
- Hamilton GS, Lysiak JJ, Han VK, Lala PK. 1998. Autocrine-paracrine regulation of human trophoblast invasiveness by insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF-binding protein (IGFBP)-1. *Exp Cell Res*, 244 (1):147-156.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404 (6775):293-296.
- Hanifin JM, Schneider LC, Leung DY, Ellis CN, Jaffe HS, Izu AE, Bucalo LR, Hirabayashi SE, Tofte SJ, Cantu-Gonzales G, et al. 1993. Recombinant interferon gamma therapy for atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*, 28 (2 Pt 1):189-197.
- Hari KL, Cook KR, Karpen GH. 2001. The *Drosophila* Su(var)2-10 locus regulates chromosome structure and function and encodes a member of the PIAS protein family. *Genes Dev*, 15 (11):1334-1348.

- He B, You L, Uematsu K, Zang K, Xu Z, Lee AY, Costello JF, McCormick F, Jablons DM. 2003. SOCS-3 is frequently silenced by hypermethylation and suppresses cell growth in human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (24):14133-14138.
- Hecker CM, Rabiller M, Haglund K, Bayer P, Dikic I. 2006. Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J Biol Chem*, 281 (23):16117-16127.
- Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*, 334 (Pt 2):297-314.
- Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*, 334 (Pt 2):297-314.
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*, 374 (Pt 1):1-20.
- Hendry L, John S. 2004. Regulation of STAT signalling by proteolytic processing. *Eur J Biochem*, 271 (23-24):4613-4620.
- Herman JG, Baylin SB. 2003. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*, 349 (21):2042-2054.
- Herrmann A, Vogt M, Monnigmann M, Clahsen T, Sommer U, Haan S, Poli V, Heinrich PC, Muller-Newen G. 2007. Nucleocytoplasmic shuttling of persistently activated STAT3. *J Cell Sci*, 120 (Pt 18):3249-3261.
- Hidden U, Wadsack C, Prutsch N, Gauster M, Weiss U, Frank HG, Schmitz U, Fast-Hirsch C, Hengstschlager M, Potgens A, Ruben A, Knofler M, Haslinger P, Huppertz B, Bilban M, Kaufmann P, Desoye G. 2007. The first trimester human trophoblast cell line ACH-3P: a novel tool to study autocrine/paracrine regulatory loops of human trophoblast subpopulations--TNF-alpha stimulates MMP15 expression. *BMC Dev Biol*, 7:137.
- Hilton DJ, Richardson RT, Alexander WS, Viney EM, Willson TA, Sprigg NS, Starr R, Nicholson SE, Metcalf D, Nicola NA. 1998. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (1):114-119.
- Hilton DJ. 1999. Negative regulators of cytokine signal transduction. *Cell Mol Life Sci*, 55 (12):1568-1577.
- Hoey T, Schindler U. 1998. STAT structure and function in signaling. *Curr Opin Genet Dev*, 8 (5):582-587.

- Horiguchi A, Oya M, Shimada T, Uchida A, Marumo K, Murai M. 2002. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 in renal cell carcinoma: a study of incidence and its association with pathological features and clinical outcome. *J Urol*, 168 (2):762-765.
- Hurskainen T, Hoyhtya M, Tuuttila A, Oikarinen A, Autio-Harmainen H. 1996. mRNA expressions of TIMP-1, -2, and -3 and 92-KD type IV collagenase in early human placenta and decidual membrane as studied by in situ hybridization. *J Histochem Cytochem*, 44 (12):1379-1388.
- Ihle JN. 1995. The Janus protein tyrosine kinase family and its role in cytokine signaling. *Adv Immunol*, 60:1-35.
- Ilmarinen T, Kangas H, Kytomaa T, Eskelin P, Saharinen J, Seeler JS, Tanhuanpaa K, Chan FY, Slattey RM, Alakurtti K, Palvimo JJ, Ulmanen I. 2008. Functional interaction of AIRE with PIAS1 in transcriptional regulation. *Mol Immunol*, 45 (7):1847-1862.
- Imada K, Leonard WJ. 2000. The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol*, 37 (1-2):1-11.
- Imakawa K, Helmer SD, Nephew KP, Meka CS, Christenson RK. 1993. A novel role for GM-CSF: enhancement of pregnancy specific interferon production, ovine trophoblast protein-1. *Endocrinology*, 132 (4):1869-1871.
- Isobe A, Takeda T, Sakata M, Yamamoto T, Minekawa R, Hayashi M, Auernhammer CJ, Tasaka K, Murata Y. 2006. STAT3-mediated constitutive expression of SOCS3 in an undifferentiated rat trophoblast-like cell line. *Placenta*, 27 (8):912-918.
- Jackson PK. 2001. A new RING for SUMO: wrestling transcriptional responses into nuclear bodies with PIAS family E3 SUMO ligases. *Genes Dev*, 15 (23):3053-3058.
- Janeway CA, Jr., Flavell RA. 1999. Immunology at Yale. *Immunol Res*, 19 (2-3):105-106.
- Jasper MJ, Tremellen KP, Robertson SA. 2007. Reduced expression of IL-6 and IL-1alpha mRNAs in secretory phase endometrium of women with recurrent miscarriage. *J Reprod Immunol*, 73 (1):74-84.
- Jauniaux E, Gulbis B, Schandene L, Collette J, Hustin J. 1996. Distribution of interleukin-6 in maternal and embryonic tissues during the first trimester. *Mol Hum Reprod*, 2 (4):239-243.
- Joazeiro CA, Weissman AM. 2000. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell*, 102 (5):549-552.
- Johan MF, Bowen DT, Frew ME, Goodeve AC, Reilly JT. 2005. Aberrant methylation of the negative regulators RASSF1A, SHP-1 and SOCS-1 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 129 (1):60-65.

- Johnson ES, Gupta AA. 2001. An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell*, 106 (6):735-744.
- Jones PA, Laird PW. 1999. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet*, 21 (2):163-167.
- Junicho A, Matsuda T, Yamamoto T, Kishi H, Korkmaz K, Saatcioglu F, Fuse H, Muraguchi A. 2000. Protein inhibitor of activated STAT3 regulates androgen receptor signaling in prostate carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 278 (1):9-13.
- Kahyo T, Nishida T, Yasuda H. 2001. Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol Cell*, 8 (3):713-718.
- Kakumu S, Ishikawa T, Wakita T, Yoshioka K, Takayanagi M, Tahara H, Kusakabe A. 1994. Interferon-gamma production specific for hepatitis B virus antigen by intrahepatic T lymphocytes in patients with acute and chronic hepatitis B. *Am J Gastroenterol*, 89 (1):92-96.
- Kamohara H, Ogawa M, Ishiko T, Sakamoto K, Baba H. 2007. Leukemia inhibitory factor functions as a growth factor in pancreas carcinoma cells: Involvement of regulation of LIF and its receptor expression. *Int J Oncol*, 30 (4):977-983.
- Kashiwada M, Giallourakis CC, Pan PY, Rothman PB. 2001. Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif of the IL-4 receptor associates with SH2-containing phosphatases and regulates IL-4-induced proliferation. *J Immunol*, 167 (11):6382-6387.
- Kauma SW, Bae-Jump V, Walsh SW. 1999. Hepatocyte growth factor stimulates trophoblast invasion: a potential mechanism for abnormal placentation in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab*, 84 (11):4092-4096.
- Keith L. 2007. Embriologie. (ELSEVIER URBAN & FISCHER)
- Kimber SJ. 2005. Leukaemia inhibitory factor in implantation and uterine biology. *Reproduction*, 130 (2):131-145.
- Kipp M, Gohring F, Ostendorp T, van Drunen CM, van Driel R, Przybylski M, Fackelmayer FO. 2000. SAF-Box, a conserved protein domain that specifically recognizes scaffold attachment region DNA. *Mol Cell Biol*, 20 (20):7480-7489.
- Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. 2002. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*, 285 (1-2):1-24.
- Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF, 3rd. 1986. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology*, 118 (4):1567-1582.

- Kliman H. 1998. From Trophoblast to Human Placenta. *Encyclopedia of Reproduction*, Klingmuller U, Lorenz U, Cantley LC, Neel BG, Lodish HF. 1995. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell*, 80 (5):729-738.
- Kluge A, Dabir S, Kern J, Nethery D, Halmos B, Ma P, Dowlati A. 2009. Cooperative interaction between protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription-3 with epidermal growth factor receptor blockade in lung cancer. *Int J Cancer*, 125 (7):1728-1734.
- Knight M, Redman CW, Linton EA, Sargent IL. 1998. Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol*, 105 (6):632-640.
- Kohler PO, Bridson WE. 1971. Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 32 (5):683-687.
- Kohler PO, Bridson WE. 1971. Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 32 (5):683-687.
- Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, Hatayama H, Fujimoto M, Narukawa S, Higuchi T, Kaneko Y, Mori T, Fujita J. 1995. Expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) receptor in human placenta: a possible role for LIF in the growth and differentiation of trophoblasts. *Hum Reprod*, 10 (7):1907-1911.
- Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, Hatayama H, Fujimoto M, Narukawa S, Higuchi T, Kaneko Y, Mori T, Fujita J. 1995. Expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) receptor in human placenta: a possible role for LIF in the growth and differentiation of trophoblasts. *Hum Reprod*, 10 (7):1907-1911.
- Koldovsky U. 1999. [Combined aspects of pregnancy and tumor immunology]. *Zentralbl Gynakol*, 121 (4):185-189.
- Kondera-Anasz Z, Sikora J, Mielczarek-Palacz A. 2004. Leukemia inhibitory factor: an important regulator of endometrial function. *Am J Reprod Immunol*, 52 (2):97-105.
- Kotaja N, Karvonen U, Janne OA, Palvimo JJ. 2002. PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. *Mol Cell Biol*, 22 (14):5222-5234.
- Krauss T, Pauer HU, Augustin HG. 2004. Prospective analysis of placenta growth factor (PIGF) concentrations in the plasma of women with normal pregnancy and pregnancies complicated by preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*, 23 (1):101-111.
- Krebs DL, Hilton DJ. 2001. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells*, 19 (5):378-387.

- Krown SE. 1987. The role of interferon in the therapy of epidemic Kaposi's sarcoma. *Semin Oncol*, 14 (2 Suppl 3):27-33.
- Krown SE. 1987. Interferon treatment of renal cell carcinoma. Current status and future prospects. *Cancer*, 59 (3 Suppl):647-651.
- Kubo M, Hanada T, Yoshimura A. 2003. Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nat Immunol*, 4 (12):1169-1176.
- Laird SM, Tuckerman EM, Dalton CF, Dunphy BC, Li TC, Zhang X. 1997. The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture. *Hum Reprod*, 12 (3):569-574.
- Lee SH, Sinko PJ. 2006. siRNA--getting the message out. *Eur J Pharm Sci*, 27 (5):401-410.
- Lemmel EM, Gaus W, Hofschneider PH. 1991. Multicenter double-blind trial of interferon-gamma versus placebo in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 34 (12):1621-1622.
- Leonard WJ, O'Shea JJ. 1998. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol*, 16:293-322.
- Leonard BE, Song C. 1999. Stress, depression, and the role of cytokines. *Adv Exp Med Biol*, 461:251-265.
- Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA. 2004. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med*, 350 (7):672-683.
- Levy C, Nechushtan H, Razin E. 2002. A new role for the STAT3 inhibitor, PIAS3: a repressor of microphthalmia transcription factor. *J Biol Chem*, 277 (3):1962-1966.
- Liang Y, Jin Y, Li Y. 2009. Expression of JAKs/STATs pathway molecules in rat model of rapid focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol*, 24 (9):1661-1671.
- Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML, Chiu K, Corwin NM, Esteves RA, Grobely D, Galardy R, Damsky CH, Fisher SJ. 1991. 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J Cell Biol*, 113 (2):437-449.
- Licht P, Russu V, Wildt L. 2001. On the role of human chorionic gonadotropin (hCG) in the embryo-endometrial microenvironment: implications for differentiation and implantation. *Semin Reprod Med*, 19 (1):37-47.
- Lin CQ, Bissell MJ. 1993. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J*, 7 (9):737-743.

- Liu B, Liao J, Rao X, Kushner SA, Chung CD, Chang DD, Shuai K. 1998. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (18):10626-10631.
- Liu B, Gross M, ten Hoeve J, Shuai K. 2001. A transcriptional corepressor of Stat1 with an essential LXXLL signature motif. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (6):3203-3207.
- Liu B, Mink S, Wong KA, Stein N, Getman C, Dempsey PW, Wu H, Shuai K. 2004. PIAS1 selectively inhibits interferon-inducible genes and is important in innate immunity. *Nat Immunol*, 5 (9):891-898.
- Liu B, Yang R, Wong KA, Getman C, Stein N, Teitell MA, Cheng G, Wu H, Shuai K. 2005. Negative regulation of NF-kappaB signaling by PIAS1. *Mol Cell Biol*, 25 (3):1113-1123.
- Loffler D, Brocke-Heidrich K, Pfeifer G, Stocsits C, Hackermuller J, Kretzschmar AK, Burger R, Gramatzki M, Blumert C, Bauer K, Cvijic H, Ullmann AK, Stadler PF, Horn F. 2007. Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. *Blood*, 110 (4):1330-1333.
- Long J, Matsuura I, He D, Wang G, Shuai K, Liu F. 2003. Repression of Smad transcriptional activity by PIASy, an inhibitor of activated STAT. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (17):9791-9796.
- Lottspeich. 1998. Bioanalytik, (Akademischer Verlag)
- Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F. 2007. Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol*, 5:6.
- Machold KP, Neumann K, Smolen JS. 1992. Recombinant human interferon gamma in the treatment of rheumatoid arthritis: double blind placebo controlled study. *Ann Rheum Dis*, 51 (9):1039-1043.
- Madhok R, Crilly A, Murphy E, Smith J, Watson J, Capell HA. 1993. Gold therapy lowers serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 20 (4):630-633.
- Madhok R, Crilly A, Watson J, Capell HA. 1993. Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity. *Ann Rheum Dis*, 52 (3):232-234.
- Marine JC, McKay C, Wang D, Topham DJ, Parganas E, Nakajima H, Pendeville H, Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A, Ihle JN. 1999. SOCS3 is essential in the regulation of fetal liver erythropoiesis. *Cell*, 98 (5):617-627.
- Marine JC, Topham DJ, McKay C, Wang D, Parganas E, Stravopodis D, Yoshimura A, Ihle JN. 1999. SOCS1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality. *Cell*, 98 (5):609-616.



- Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T. 2002. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, 110 (5):563-574.
- Massa PT, Wu C, Fecenko-Tacka K. 2004. Dysmyelination and reduced myelin basic protein gene expression by oligodendrocytes of SHP-1-deficient mice. *J Neurosci Res*, 77 (1):15-25.
- Matsuguchi T, Zhao Y, Lilly MB, Kraft AS. 1997. The cytoplasmic domain of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) receptor alpha subunit is essential for both GM-CSF-mediated growth and differentiation. *J Biol Chem*, 272 (28):17450-17459.
- McHale K, Tomaszewski JE, Puthiyaveetil R, Livolsi VA, Clevenger CV. 2008. Altered expression of prolactin receptor-associated signaling proteins in human breast carcinoma. *Mod Pathol*, 21 (5):565-571.
- McInnes GT. 2003. The expanding role of angiotensin receptor blockers in the management of the elderly hypertensive. *Curr Med Res Opin*, 19 (5):452-455.
- Meisser A, Cameo P, Islami D, Campana A, Bischof P. 1999. Effects of interleukin-6 (IL-6) on cytotrophoblastic cells. *Mol Hum Reprod*, 5 (11):1055-1058.
- Minty A, Dumont X, Kaghad M, Caput D. 2000. Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif. *J Biol Chem*, 275 (46):36316-36323.
- Moore MA. 1991. The clinical use of colony stimulating factors. *Annu Rev Immunol*, 9:159-191.
- Morrish DW, Dakour J, Li H. 1998. Functional regulation of human trophoblast differentiation. *J Reprod Immunol*, 39 (1-2):179-195.
- Murray MJ, Lessey BA. 1999. Embryo implantation and tumor metastasis: common pathways of invasion and angiogenesis. *Semin Reprod Endocrinol*, 17 (3):275-290.
- Murray MJ, Lessey BA. 1999. Embryo implantation and tumor metastasis: common pathways of invasion and angiogenesis. *Semin Reprod Endocrinol*, 17 (3):275-290.
- Nakayama T, Yoshizaki A, Izumida S, Suehiro T, Miura S, Uemura T, Yakata Y, Shichijo K, Yamashita S, Sekin I. 2007. Expression of interleukin-11 (IL-11) and IL-11 receptor alpha in human gastric carcinoma and IL-11 upregulates the invasive activity of human gastric carcinoma cells. *Int J Oncol*, 30 (4):825-833.
- Nasu K, Zhou Y, McMaster MT, Fisher SJ. 2000. Upregulation of human cytotrophoblast invasion by hepatocyte growth factor. *J Reprod Fertil Suppl*, 55:73-80.



- Nicolini A, Carpi A, Rossi G. 2006. Cytokines in breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 17 (5):325-337.
- Nishino H, Miyata M, Kitamura K. 1998. The effect of interleukin-6 on enhancing the invasiveness of head and neck cancer cells in vitro. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 255 (9):468-472.
- Niu R, Okamoto T, Iwase K, Nomura S, Mizutani S. 2000. Quantitative analysis of matrix metalloproteinases-2 and -9, and their tissue inhibitors-1 and -2 in human placenta throughout gestation. *Life Sci*, 66 (12):1127-1137.
- Niu G, Bowman T, Huang M, Shivers S, Reintgen D, Daud A, Chang A, Kraker A, Jove R, Yu H. 2002. Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth. *Oncogene*, 21 (46):7001-7010.
- Niwa Y, Kanda H, Shikauchi Y, Saiura A, Matsubara K, Kitagawa T, Yamamoto J, Kubo T, Yoshikawa H. 2005. Methylation silencing of SOCS-3 promotes cell growth and migration by enhancing JAK/STAT and FAK signalings in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 24 (42):6406-6417.
- Nykanen A, Haley B, Zamore PD. 2001. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*, 107 (3):309-321.
- Obata NH, Tamakoshi K, Shibata K, Kikkawa F, Tomoda Y. 1997. Effects of interleukin-6 on in vitro cell attachment, migration and invasion of human ovarian carcinoma. *Anticancer Res*, 17 (1A):337-342.
- Oka T, Ouchida M, Koyama M, Ogama Y, Takada S, Nakatani Y, Tanaka T, Yoshino T, Hayashi K, Ohara N, Kondo E, Takahashi K, Tsuchiyama J, Tanimoto M, Shimizu K, Akagi T. 2002. Gene silencing of the tyrosine phosphatase SHP1 gene by aberrant methylation in leukemias/lymphomas. *Cancer Res*, 62 (22):6390-6394.
- Oktay K, Brzyski RG, Miller EB, Krugman D. 1994. Association of serum beta-hCG levels with myosalpingeal invasion and viable trophoblast mass in tubal pregnancy. *Obstet Gynecol*, 84 (5):803-806.
- Okubo S, Hara F, Tsuchida Y, Shimotakahara S, Suzuki S, Hatanaka H, Yokoyama S, Tanaka H, Yasuda H, Shindo H. 2004. NMR structure of the N-terminal domain of SUMO ligase PIAS1 and its interaction with tumor suppressor p53 and A/T-rich DNA oligomers. *J Biol Chem*, 279 (30):31455-31461.
- Omi K, Tokunaga K, Hohjoh H. 2004. Long-lasting RNAi activity in mammalian neurons. *FEBS Lett*, 558 (1-3):89-95.
- Parham P. 2004. NK cells and trophoblasts: partners in pregnancy. *J Exp Med*, 200 (8):951-955.

- Paulesu L, Bocci V, King A, Loke YM. 1991. Immunocytochemical localization of interferons in human trophoblast populations. *J Biol Regul Homeost Agents*, 5 (3):81-85.
- Perricone R, De Carolis C, Giacomelli R, Guarino MD, De Sanctis G, Fontana L. 2003. GM-CSF and pregnancy: evidence of significantly reduced blood concentrations in unexplained recurrent abortion efficiently reverted by intravenous immunoglobulin treatment. *Am J Reprod Immunol*, 50 (3):232-237.
- Pignatelli M, Vessey CJ. 1994. Adhesion molecules: novel molecular tools in tumor pathology. *Hum Pathol*, 25 (9):849-856.
- Poehlmann T, Bashar S, Markert UR, Caniggia I, Han V, Croy BA, Tayade C. 2004. There are many approaches to the culture of human trophoblast but few that facilitate study of complex interactions between fetal and maternal tissues. *Placenta*, 25 (4):357-358.
- Poehlmann TG, Fitzgerald JS, Meissner A, Wengenmayer T, Schleussner E, Friedrich K, Markert UR. 2005. Trophoblast invasion: tuning through LIF, signalling via Stat3. *Placenta*, 26 Suppl A:S37-41.
- Poehlmann TG, Busch S, Mussil B, Winzer H, Weinert J, Mebes I, Schaumann A, Fitzgerald JS, Markert UR. 2005. The possible role of the Jak/STAT pathway in lymphocytes at the fetomaternal interface. *Chem Immunol Allergy*, 89:26-35.
- Pollheimer J, Knofler M. 2005. Signalling pathways regulating the invasive differentiation of human trophoblasts: a review. *Placenta*, 26 Suppl A:S21-30.
- Pschyrembel. 1993. *Klinisches Wörterbuch*. (257. Auflage )
- Puricelli L, Proietti CJ, Labriola L, Salatino M, Balana ME, Aguirre Ghiso J, Lupu R, Pignataro OP, Charreau EH, Bal de Kier Joffe E, Elizalde PV. 2002. Heregulin inhibits proliferation via ERKs and phosphatidyl-inositol 3-kinase activation but regulates urokinase plasminogen activator independently of these pathways in metastatic mammary tumor cells. *Int J Cancer*, 100 (6):642-653.
- Qu CK. 2002. Role of the SHP-2 tyrosine phosphatase in cytokine-induced signaling and cellular response. *Biochim Biophys Acta*, 1592 (3):297-301.
- Rakesh K, Agrawal DK. 2005. Cytokines and growth factors involved in apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Int Immunopharmacol*, 5 (10):1487-1506.
- Rakesh K, Agrawal DK. 2005. Controlling cytokine signaling by constitutive inhibitors. *Biochem Pharmacol*, 70 (5):649-657.
- Redman CW, Sargent IL. 2000. Placental debris, oxidative stress and pre-eclampsia. *Placenta*, 21 (7):597-602.

- Redman CW, Sargent IL. 2003. Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response--a review. *Placenta*, 24 Suppl A:S21-27.
- Reichel RP, Fitz R, Neumann R, Pohl-Markl H, Pichler E, Hoffer Z, Budiman R. 1992. Clinical study with recombinant interferon gamma versus interferon alpha-2c in patients with condylomata acuminata. *Int J STD AIDS*, 3 (5):350-354.
- Roberts AW, Robb L, Rakar S, Hartley L, Cluse L, Nicola NA, Metcalf D, Hilton DJ, Alexander WS. 2001. Placental defects and embryonic lethality in mice lacking suppressor of cytokine signaling 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (16):9324-9329.
- Robertson SA, Seamark RF. 1992. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF): one of a family of epithelial cell-derived cytokines in the preimplantation uterus. *Reprod Fertil Dev*, 4 (4):435-448.
- Robertson SA, Roberts CT, Farr KL, Dunn AR, Seamark RF. 1999. Fertility impairment in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. *Biol Reprod*, 60 (2):251-261.
- Rogers RS, Horvath CM, Matunis MJ. 2003. SUMO modification of STAT1 and its role in PIAS-mediated inhibition of gene activation. *J Biol Chem*, 278 (32):30091-30097.
- Rubin BY, Gupta SL. 1980. Differential efficacies of human type I and type II interferons as antiviral and antiproliferative agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77 (10):5928-5932.
- Sachdev S, Bruhn L, Sieber H, Pichler A, Melchior F, Grosschedl R. 2001. PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev*, 15 (23):3088-3103.
- Sadler T. 1998. *Medizinische Embryologie*. 9. Auflage
- Saito S, Sakakura S, Enomoto M, Ichijo M, Matsumoto K, Nakamura T. 1995. Hepatocyte growth factor promotes the growth of cytotrophoblasts by the paracrine mechanism. *J Biochem*, 117 (3):671-676.
- Santoro N, Goldsmith LT, Heller D, Illsley N, McGovern P, Molina C, Peters S, Skurnick JH, Forst C, Weiss G. 2000. Luteal progesterone relates to histological endometrial maturation in fertile women. *J Clin Endocrinol Metab*, 85 (11):4207-4211.
- Sapetschnig A, Rischitor G, Braun H, Doll A, Schergaut M, Melchior F, Suske G. 2002. Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *EMBO J*, 21 (19):5206-5215.
- Sargent IL, Germain SJ, Sacks GP, Kumar S, Redman CW. 2003. Trophoblast deportation and the maternal inflammatory response in pre-eclampsia. *J Reprod Immunol*, 59 (2):153-160.

- Schaefer LK, Ren Z, Fuller GN, Schaefer TS. 2002. Constitutive activation of Stat3alpha in brain tumors: localization to tumor endothelial cells and activation by the endothelial tyrosine kinase receptor (VEGFR-2). *Oncogene*, 21 (13):2058-2065.
- Schieffer B, Selle T, Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Grote K, Tietge UJ, Trautwein C, Luchtefeld M, Schmittkamp C, Heeneman S, Daemen MJ, Drexler H. 2004. Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis. *Circulation*, 110 (22):3493-3500.
- Schindler C, Darnell JE, Jr. 1995. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem*, 64:621-651.
- Schindler C, Levy DE, Decker T. 2007. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem*, 282 (28):20059-20063.
- Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschesche W, Sharpe M, Gherardi E, Birchmeier C. 1995. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature*, 373 (6516):699-702.
- Sentis S, Le Romancer M, Bianchin C, Rostan MC, Corbo L. 2005. Sumoylation of the estrogen receptor alpha hinge region regulates its transcriptional activity. *Mol Endocrinol*, 19 (11):2671-2684.
- Sharkey AM, Dellow K, Blayney M, Macnamee M, Charnock-Jones S, Smith SK. 1995. Stage-specific expression of cytokine and receptor messenger ribonucleic acids in human preimplantation embryos. *Biol Reprod*, 53 (4):974-981.
- Sharkey A. 1998. Cytokines and implantation. *Rev Reprod*, 3 (1):52-61.
- Shih Ie M, Kurman RJ. 2002. Molecular basis of gestational trophoblastic diseases. *Curr Mol Med*, 2 (1):1-12.
- Shuai K, Horvath CM, Huang LH, Qureshi SA, Cowburn D, Darnell JE, Jr. 1994. Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell*, 76 (5):821-828.
- Shuai K, Liu B. 2005. Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 5 (8):593-605.
- Shuai K. 2006. Regulation of cytokine signaling pathways by PIAS proteins. *Cell Res*, 16 (2):196-202.
- Simon C, Frances A, Piquette GN, el Danasouri I, Zurawski G, Dang W, Polan ML. 1994. Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist. *Endocrinology*, 134 (2):521-528.
- Smola-Hess S, Schnitzler R, Hadaschik D, Smola H, Mauch C, Krieg T, Pfister H. 2001. CD40L induces matrix-metalloproteinase-9 but not tissue inhibitor of

- metalloproteinases-1 in cervical carcinoma cells: imbalance between NF-kappaB and STAT3 activation. *Exp Cell Res*, 267 (2):205-215.
- Snapper CM, Peschel C, Paul WE. 1988. IFN-gamma stimulates IgG2a secretion by murine B cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol*, 140 (7):2121-2127.
- Sonnenberg A, Linders CJ, Daams JH, Kennel SJ. 1990. The alpha 6 beta 1 (VLA-6) and alpha 6 beta 4 protein complexes: tissue distribution and biochemical properties. *J Cell Sci*, 96 ( Pt 2):207-217.
- Starkel P, Saeger CD, Leclercq I, Horsmans Y. 2007. Role of signal transducer and activator of transcription 3 in liver fibrosis progression in chronic hepatitis C-infected patients. *Lab Invest*, 87 (2):173-181.
- Starr R, Hilton DJ. 1999. Negative regulation of the JAK/STAT pathway. *Bioessays*, 21 (1):47-52.
- Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E. 2004. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol*, 2:59.
- Staun-Ram E, Shalev E. 2005. Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod Biol Endocrinol*, 3:56.
- Steinbach F, Mauel S, Beier I. 2002. Recombinant equine interferons: expression cloning and biological activity. *Vet Immunol Immunopathol*, 84 (1-2):83-95.
- Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, Abbondanzo SJ. 1992. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, 359 (6390):76-79.
- Stewart F. 1996. Roles of mesenchymal-epithelial interactions and hepatocyte growth factor-scatter factor (HGF-SF) in placental development. *Rev Reprod*, 1 (3):144-148.
- Stewart CL, Cullinan EB. 1997. Preimplantation development of the mammalian embryo and its regulation by growth factors. *Dev Genet*, 21 (1):91-101.
- Stielow B, Sapetschnig A, Wink C, Kruger I, Suske G. 2008. SUMO-modified Sp3 represses transcription by provoking local heterochromatic gene silencing. *EMBO Rep*, 9 (9):899-906.
- Stielow B, Sapetschnig A, Kruger I, Kunert N, Brehm A, Boutros M, Suske G. 2008. Identification of SUMO-dependent chromatin-associated transcriptional repression components by a genome-wide RNAi screen. *Mol Cell*, 29 (6):742-754.
- Sunder S, Lenton EA. 2000. Endocrinology of the peri-implantation period. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 14 (5):789-800.

- Symes A, Stahl N, Reeves SA, Farruggella T, Servidei T, Gearan T, Yancopoulos G, Fink JS. 1997. The protein tyrosine phosphatase SHP-2 negatively regulates ciliary neurotrophic factor induction of gene expression. *Curr Biol*, 7 (9):697-700.
- Tabibzadeh S, Kong QF, Babaknia A, May LT. 1995. Progressive rise in the expression of interleukin-6 in human endometrium during menstrual cycle is initiated during the implantation window. *Hum Reprod*, 10 (10):2793-2799.
- Tahk S, Liu B, Chernishof V, Wong KA, Wu H, Shuai K. 2007. Control of specificity and magnitude of NF-kappa B and STAT1-mediated gene activation through PIASy and PIAS1 cooperation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (28):11643-11648.
- Takahashi Y, Carpino N, Cross JC, Torres M, Parganas E, Ihle JN. 2003. SOCS3: an essential regulator of LIF receptor signaling in trophoblast giant cell differentiation. *EMBO J*, 22 (3):372-384.
- Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. 1997. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (8):3801-3804.
- Tan JA, Hall SH, Hamil KG, Grossman G, Petrusz P, French FS. 2002. Protein inhibitors of activated STAT resemble scaffold attachment factors and function as interacting nuclear receptor coregulators. *J Biol Chem*, 277 (19):16993-17001.
- Tartaglia M, Mehler EL, Goldberg R, Zampino G, Brunner HG, Kremer H, van der Burgt I, Crosby AH, Ion A, Jeffery S, Kalidas K, Patton MA, Kucherlapati RS, Gelb BD. 2001. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet*, 29 (4):465-468.
- Tartakovsky B, Goldstein O, Brosh N. 1991. Colony-stimulating factor-1 blocks early pregnancy in mice. *Biol Reprod*, 44 (5):906-912.
- Tian SS, Lamb P, Seidel HM, Stein RB, Rosen J. 1994. Rapid activation of the STAT3 transcription factor by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*, 84 (6):1760-1764.
- Tidow N, Kasper B, Welte K. 1999. SH2-containing protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 are dramatically increased at the protein level in neutrophils from patients with severe congenital neutropenia (Kostmann's syndrome). *Exp Hematol*, 27 (6):1038-1045.
- Torry DS, Mukherjee D, Arroyo J, Torry RJ. 2003. Expression and function of placenta growth factor: implications for abnormal placentation. *J Soc Gynecol Investig*, 10 (4):178-188.
- Trovato M, Grosso M, Vitarelli E, Benvenga S, Trimarchi F, Barresi G. 2002. Immunoexpression of the hepatocyte growth factor (HGF), HGF-receptor (c-met)



- and STAT3 on placental tissues from malformed fetuses. *Histol Histopathol*, 17 (3):691-698.
- Tsui HW, Hasselblatt K, Martin A, Mok SC, Tsui FW. 2002. Molecular mechanisms underlying SHP-1 gene expression. *Eur J Biochem*, 269 (12):3057-3064.
- Udayakumar TS, Stratton MS, Nagle RB, Bowden GT. 2002. Fibroblast growth factor-1 induced promatrilysin expression through the activation of extracellular-regulated kinases and STAT3. *Neoplasia*, 4 (1):60-67.
- Uehara Y, Minowa O, Mori C, Shiota K, Kuno J, Noda T, Kitamura N. 1995. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature*, 373 (6516):702-705.
- Ungureanu D, Vanhatupa S, Kotaja N, Yang J, Aittomaki S, Janne OA, Palvimo JJ, Silvennoinen O. 2003. PIAS proteins promote SUMO-1 conjugation to STAT1. *Blood*, 102 (9):3311-3313.
- Valentino L, Pierre J. 2006. JAK/STAT signal transduction: regulators and implication in hematological malignancies. *Biochem Pharmacol*, 71 (6):713-721.
- van den Broek MF, Kagi D, Zinkernagel RM, Hengartner H. 1995. Perforin dependence of natural killer cell-mediated tumor control in vivo. *Eur J Immunol*, 25 (12):3514-3516.
- Vandermolen DT, Gu Y. 1996. Human endometrial interleukin-6 (IL-6): in vivo messenger ribonucleic acid expression, in vitro protein production, and stimulation thereof by IL-1 beta. *Fertil Steril*, 66 (5):741-747.
- Voet. 2002. *Lehrbuch der Biochemie*, (WILEY-VHC Verlag)
- Vogiagis D, Salamonsen LA. 1999. Review: The role of leukaemia inhibitory factor in the establishment of pregnancy. *J Endocrinol*, 160 (2):181-190.
- Wang L, Banerjee S. 2004. Differential PIAS3 expression in human malignancy. *Oncol Rep*, 11 (6):1319-1324.
- Watson AJ. 1992. The cell biology of blastocyst development. *Mol Reprod Dev*, 33 (4):492-504.
- Weiss U, Cervar M, Puerstner P, Schmut O, Haas J, Mauschitz R, Arikan G, Desoye G. 2001. Hyperglycaemia in vitro alters the proliferation and mitochondrial activity of the choriocarcinoma cell lines BeWo, JAR and JEG-3 as models for human first-trimester trophoblast. *Diabetologia*, 44 (2):209-219.
- Wink C. 2004. *Konzepte und Methoden. Molekulare Biotechnologie*, (WILEY-VCH Verlag)
- Wormald S, Hilton DJ. 2004. Inhibitors of cytokine signal transduction. *J Biol Chem*, 279 (2):821-824.

- Wysoczynski M, Miekus K, Jankowski K, Wanzeck J, Bertolone S, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ratajczak MZ. 2007. Leukemia inhibitory factor: a newly identified metastatic factor in rhabdomyosarcomas. *Cancer Res*, 67 (5):2131-2140.
- Xu X, Sun YL, Hoey T. 1996. Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science*, 273 (5276):794-797.
- Yagil Z, Nechushtan H, Kay G, Yang CM, Kemeny DM, Razin E. The enigma of the role of protein inhibitor of activated STAT3 (PIAS3) in the immune response. *Trends Immunol*, 31 (5):199-204.
- Yagil Z, Kay G, Nechushtan H, Razin E. 2009. A specific epitope of protein inhibitor of activated STAT3 is responsible for the induction of apoptosis in rat transformed mast cells. *J Immunol*, 182 (4):2168-2175.
- Yetter A, Uddin S, Krolewski JJ, Jiao H, Yi T, Platanias LC. 1995. Association of the interferon-dependent tyrosine kinase Tyk-2 with the hematopoietic cell phosphatase. *J Biol Chem*, 270 (31):18179-18182.
- Yi T, Zhang J, Miura O, Ihle JN. 1995. Hematopoietic cell phosphatase associates with erythropoietin (Epo) receptor after Epo-induced receptor tyrosine phosphorylation: identification of potential binding sites. *Blood*, 85 (1):87-95.
- Yoshimura A. 2005. Negative regulation of cytokine signaling. *Clin Rev Allergy Immunol*, 28 (3):205-220.
- Yoshizaki A, Nakayama T, Yamazumi K, Yakata Y, Taba M, Sekine I. 2006. Expression of interleukin (IL)-11 and IL-11 receptor in human colorectal adenocarcinoma: IL-11 up-regulation of the invasive and proliferative activity of human colorectal carcinoma cells. *Int J Oncol*, 29 (4):869-876.
- Zhang Q, Wang HY, Marzec M, Raghunath PN, Nagasawa T, Wasik MA. 2005. STAT3- and DNA methyltransferase 1-mediated epigenetic silencing of SHP-1 tyrosine phosphatase tumor suppressor gene in malignant T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (19):6948-6953.
- Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Jr. 1994. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*, 264 (5155):95-98.